

I. PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **2004-089195**
(43)Date of publication of application : **25.03.2004**

(51)Int.Cl. **C12N 15/09**

(21)Application number : **2003-306141** (71)Applicant : **F HOFFMANN LA ROCHE AG**
(22)Date of filing : **29.08.2003** (72)Inventor : **MARKERT-HAHN CHRISTINE
BLOCK DIRK**

(30)Priority

Priority number : **2002 02019097** Priority date : **29.08.2002** Priority country : **EP**
2002 02028114 **18.12.2002** **EP**

(54) IMPROVED METHOD FOR BISULFITE TREATMENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide bisulfite reaction capable of being easily conducted under manual operation, capable of using a solid phase, especially magnetic glass particles, which is treated with conventional analyzers, and capable of being successfully conducted in a satisfactory manner, because a nucleic acid is bound to surfaces of the solid phase by various interactions which have effects on success of the bisulfite reaction.

SOLUTION: A method for transforming a cytosine base in the nucleic acid into a uracil base comprises binding the nucleic acid to the solid phase in a deamination process and/or in a desulfonation process. Further, the method for transforming the cytosine base in the nucleic acid into the uracil base comprises using the solid phase in the deamination process in which the cytosine base in the nucleic acid is transformed into the uracil base in the presence of bisulfite ions and/or in the desulfonation process. The kit for conducting the bisulfite reaction contains a solution containing the bisulfite ions and the solid phase.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]

A converting method to an uracil base of a cytosine base in nucleic acid, wherein nucleic acid is combined by solid phase in a deamination process and/or a desulfonation process.

[Claim 2]

- a) A process of combining nucleic acid with solid phase,
- b) A process to which solid phase joint nucleic acid is incubated under existence of hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause,

- c) A process of washing deamination solid phase joint nucleic acid arbitrarily,
- d) A process which incubates deamination solid phase joint nucleic acid under alkali conditions that deamination nucleic acid is desulfonated by that cause,
- e) a process of washing arbitrarily deamination desulfonation solid phase joint nucleic acid -- and
- f) A process that deamination desulfonation nucleic acid is arbitrarily eluted from solid phase
A converting method to an uracil base of a cytosine base in ***** and the nucleic acid according to claim 1.

[Claim 3]

- a) A process to which nucleic acid is incubated under existence of hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause,
- b) A process of combining deamination nucleic acid with solid phase,
- c) A process of washing deamination solid phase joint nucleic acid arbitrarily,
- d) A process which incubates deamination solid phase joint nucleic acid under alkali conditions that deamination nucleic acid is desulfonated by that cause,
- e) a process of washing arbitrarily deamination desulfonation solid phase joint nucleic acid -- and
- f) A process that deamination desulfonation nucleic acid is arbitrarily eluted from solid phase
A converting method to an uracil base of a cytosine base in ***** and the nucleic acid according to claim 1.

[Claim 4]

- a) A process of combining nucleic acid with solid phase,
- b) A process to which solid phase joint nucleic acid is incubated under existence of hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause,
- c) A process of washing solid phase joint nucleic acid arbitrarily,
- d) a process that deamination nucleic acid is eluted from solid phase -- and
- e) A process which incubates deamination nucleic acid under alkali conditions that deamination nucleic acid is desulfonated by that cause
A converting method to an uracil base of a cytosine base in ***** and the nucleic acid according to claim 1.

[Claim 5]

claims 1-4, wherein solid phase is the material containing silica or glass -- either -- a method of a statement.

[Claim 6]

claims 1-5, wherein solid phase is glass fleece or glass membrane -- either -- a method of a statement.

[Claim 7]

claims 1-5, wherein solid phase is a magnetic glass particle -- either -- a method of a statement.

[Claim 8]

A method according to claim 7, wherein a magnetic glass particle has an average diameter which are 0.5 micrometer - 5 micrometers.

[Claim 9]

A method according to claim 7 or 8, wherein a magnetic glass particle contains a magnetic body which has a diameter which is 5-500 nm.

[Claim 10]

A method according to claim 9, wherein a magnetic glass particle contains a magnetic body which has an average diameter which is 23 nm.

[Claim 11]

claims 7-10, wherein a magnetic glass particle is manufactured by a sol-gel method -- either -- a method of a statement.

[Claim 12]

Said sol-gel method.

- a) A process that a magnetic body is suspended in sol,
 - b) A process of hydrolyzing this sol and covering a magnetic body by gel,
 - c) a process of carrying out spray drying of the magnetic body covered by gel in a two nozzle spray dryer -- and
 - d) A process of sintering spray drying powder and forming glass for a magnetic body from wrap gel
- ******, a method according to claim 11.

[Claim 13]

Use of solid phase in a deamination process and/or a desulfonation process of a reaction that a cytosine base in nucleic acid is changed into an uracil base under existence of hydrogen sulfite ion.

[Claim 14]

The use according to claim 13 which is the material in which solid phase contains silica or glass.

[Claim 15]

The use according to claim 13 or 14 whose solid phase is glass fleece or glass membrane.

[Claim 16]

The use according to claim 13 or 14 whose solid phase is a magnetic glass particle.

[Claim 17]

A kit for carrying out a hydrogensulfite reaction including a solution containing hydrogen sulfite ion and solid phase.

[Claim 18]

The kit according to claim 17 which is a substance in which solid phase contains silica or glass.

[Claim 19]

The kit according to claim 17 or 18 whose solid phase is glass fleece or glass membrane.

[Claim 20]

The kit according to claim 17 or 18 whose solid phase is a magnetic glass particle.

[Claim 21]

claims 17-20 for a reaction from which a cytosine base in nucleic acid is changed into an uracil base under existence of hydrogen sulfite ion -- either -- use of a kit of a statement.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

TECHNICAL FIELD

[Field of the Invention]

[0001]

In order to determine the position of the methylation in nucleic acid, i.e., methylation, and non-methylating cytosine, this application carries out a hydrogensulfite reaction and, thereby, is related with the method by which nucleic acid is combined with solid phase between the

deamination process of a hydrogensulfite reaction, and/or a desulfonation process. Solid phase is glass or silica, and a material that contains glass fleece, glass membrane, or a magnetic glass particle more preferably preferably. The kit containing the use and the hydrogensulfite reagent of solid phase, and solid phase for combining nucleic acid between the deamination process of a hydrogensulfite reaction and/or a desulfonation process is indicated.

PRIOR ART

[Background of the Invention]

[0002]

A gene constitutes only few portions of all the mammalian genomes, and exact control of the manifestation under the overwhelming existence of the background of a non-coding deoxyribonucleic acid (DNA) presents the substantial problem about the regulation. Non-coding DNA containing the intron, a repetitive element, and a potential activation transposable element needs the mechanism effective in siren SHINGU for a long period of time. It seems that mammalian provides the hereditary mechanism to which a DNA-protein interaction is changed using a possibility of being provided by cytosine methylation, and is giving this siren SHINGU. DNA methylation is indispensable to development of mammalian, and plays a potential role in aging, and cancer. The intervention [in / regulation of gene expression] of the methylation as epigenetic modification which marks the stenciled gene is fully established. In mammalian, methylation is produced in CG arrangement only in cytosine residue only in the cytosine residue which more specifically adjoins guanosine residue. The detection like a DNA methylation part and mapping are the processes that it is indispensable for an understanding of the molecule signal in which it is shown whether predetermined arrangement is methylated.

[0003]

This is attained by what is called a hydrogensulfite method about detection of 5-methylcytosine now (for example, refer to nonpatent literature 1). Although sodium hydrogen sulfite reacts to cytosine, the influence that 5-methylcytosine does not carry out a deer reaction completely or only is used for the hydrogensulfite method which maps 5-methylcytosine. Cytosine reacts to a hydrogensulfite and forms the sulfonation cytosine reaction intermediate which produces the sulfonation uracil which may be desulfonated by uracil under alkaline conditions and which is easy to carry out deamination. It is general knowledge that uracil has a base pairing action of the thymine in which educt cytosine differs, and 5-methylcytosine, on the other hand, has a base pairing action of cytosine. This becomes distinguishable [the methylation by hydrogensulfite genome sequencing or methylation specific PCR (MSP) or non-methylating cytosine], for example (for example, refer to the nonpatent literature 2, the nonpatent literature 3, or patent documents 1).

[0004]

There are various articles treating the specific aspect of affairs of a hydrogensulfite reaction (for example, refer to nonpatent literature 4), General research is done to hydrogensulfite ornamentation of 5-methyldeoxy cytosine and deoxy cytosine. The method of (for example, nonpatent literature 5 reference) and hydrogensulfite base sequencing is indicated, and it carries out on the material in which hydrogensulfite processing and the PCR process of continuing carried out embedding to the agarose bead by that cause. In a hydrogensulfite method, a sample is desalted after deamination (for example, refer to nonpatent literature 6).

[0005]

The hydrogensulfite method of 5-methylcytosine mapping which makes mold decomposition the minimum is indicated (for example, refer to nonpatent literature 7). They are studying the influence of pH, temperature, and reaction time. The same research is made (for example, refer to the nonpatent literature 8 or nonpatent literature 9). The further various ingredients in a hydrogensulfite mixture are indicated (for example, refer to the patent documents 2 or nonpatent literature 10). Hydrogensulfite processing and the further hydrogensulfite process after PCR are indicated (for example, refer to patent documents 3). It inquires about the catalyst of the hydrogensulfite derivation deamination of cytosine in oligodeoxyribonucleotide (for example, refer to nonpatent literature 11).

[0006]

The kit for carrying out hydrogensulfite processing is marketed from Intergen provided by Serologicals Corporation, Norcross GA, and USA, for example, is a CpGenomeTM DNA modification kit.

[0007]

The strange method of hydrogensulfite genome sequencing which genomic DNA is combined with a glass bead after deamination, and is washed is indicated (for example, refer to nonpatent literature 12). Nucleic acid is desulfonated after elution. It is publicly known by using adsorption to the adsorption to the joint action, for example, silica gel, or the divalent earth to a glass surface of nucleic acid, a magnetic glass particle (MGP), or the organic Silang particles under KAO TORO pick conditions that nucleic acid can isolate. Under the conditions which enable combination to the solid phase of the target substance, the solution containing nucleic acid is added to solid phase, it removes, and the remaining solutions of solid phase joint nucleic acid reach, then the extraction using solid phase usually includes the process of discharge (elution is often called) of the nucleic acid from solid phase to a liquefied eluate. The result of this method is a solution which contains the target substance in the state where it usually dissolved.

[Patent documents 1] U.S. Pat. No. 5786146 specification

[Patent documents 2] The international publication 01st/No. 98528 pamphlet

[Patent documents 3] The international publication 02nd/No. 31186 pamphlet

[Nonpatent literature 1] FUROMA ems (Frommer, M.), "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", 1992, the 89th volume, p.1827-1831

[Nonpatent literature 2] Grigg Gee (Grigg, G.) and the Clerks S (Clark, S.), "Bioessays", 1994, the 16th volume, p.431-436

[Nonpatent literature 3] The Grigg Gee W (Grigg, G.W.), "DNA Seq", 1996, the 6th volume, p.189-198

[Nonpatent literature 4] BENYA jatty See et al. (Benyajati, C.), "Nucleic Acids Res.", 1980, the 8th volume, p.5649-5667

[Nonpatent literature 5] OREKU Ey et al. (Olek, A.), "Nucleic Acids Res.", 1996, the 24th volume, p.5064-5066

[Nonpatent literature 6] Clerks S Jay et al. (Clark, S.J.), "Nucleic Acids Res.", 1994, the 22nd volume, p.2990-2997

[Nonpatent literature 7] RAIJISU Ey em (Raizis, A.M.) and "Anal. Biochem." 1995, the 226th volume, p.161-166

[Nonpatent literature 8] GURANOU See et al. (Grunau, C.), "Nucleic Acids Res.", 2001, the 29th volume, p.E65-5

[Nonpatent literature 9] WARUNEKE Py ems (Warnecke, P.M.), "Methods", 2002, the 27th

volume, p.101-107

[Nonpatent literature 10] Pauline Earl et al. (Paulin, R.), "Nucleic Acids Res.", 1998, the 26th volume, p.5009-5010

[Nonpatent literature 11] A handicap climax em (Komiyama, M.) and the Oshima S (Oshima, S.), "Tetrahedron Letters", 1994, the 35th volume, p.8185-8188

[Nonpatent literature 12] Failure Rs (Feil, R.), "Nucleic Acids Res.", 1994, the 22nd volume, p.695-696

TECHNICAL PROBLEM

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

[0008]

The method of all the advanced technology about hydrogensulfite processing has a fault. Therefore, the problem which should be solved by this invention was providing the method of overthrowing the fault of the method of the advanced technology.

[0009]

The purpose of this invention at the small-scale laboratory which cannot use an idiomatic analysis apparatus. At the large-scale laboratory which provides the hydrogensulfite reaction which can be easily carried out with hand control, and has a lot of sample throughput. Since it is combined on the surface of solid phase by various interactions which provide the solid phase which can be dealt with by an idiomatic analysis apparatus, and the hydrogensulfite reaction which especially uses a magnetic glass particle and in which nucleic acid may influence a success of a hydrogensulfite reaction, It is providing a successful feasible hydrogensulfite reaction with a satisfying form.

MEANS

[Means for Solving the Problem]

[0010]

Namely, this invention,

- (1) A converting method to an uracil base of a cytosine base in nucleic acid, wherein nucleic acid is combined by solid phase in a deamination process and/or a desulfonation process,
- (2) A process of combining a nucleic acid with solid phase,
 - b) A process to which solid phase joint nucleic acid is incubated under existence of hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause,
 - c) A process of washing deamination solid phase joint nucleic acid arbitrarily,
 - d) A process which incubates deamination solid phase joint nucleic acid under alkali conditions that deamination nucleic acid is desulfonated by that cause,
 - e) a process of washing arbitrarily deamination desulfonation solid phase joint nucleic acid -- and
 - f) A process that deamination desulfonation nucleic acid is arbitrarily eluted from solid phase ******, a converting method to an uracil base of a cytosine base in nucleic acid of the aforementioned (1) statement,
- (3) A process to which nucleic acid is incubated under existence of a hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause,

- b) A process of combining deamination nucleic acid with solid phase,
 - c) A process of washing deamination solid phase joint nucleic acid arbitrarily,
 - d) A process which incubates deamination solid phase joint nucleic acid under alkali conditions that deamination nucleic acid is desulfonated by that cause,
 - e) a process of washing arbitrarily deamination desulfonation solid phase joint nucleic acid -- and
 - f) A process that deamination desulfonation nucleic acid is arbitrarily eluted from solid phase ******, a converting method to an uracil base of a cytosine base in nucleic acid of the aforementioned (1) statement,
- (4) A process of combining a nucleic acid with solid phase,
- b) A process to which solid phase joint nucleic acid is incubated under existence of hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause,
 - c) A process of washing solid phase joint nucleic acid arbitrarily,
 - d) a process that deamination nucleic acid is eluted from solid phase -- and
 - e) A process which incubates deamination nucleic acid under alkali conditions that deamination nucleic acid is desulfonated by that cause
- ******, a converting method to an uracil base of a cytosine base in nucleic acid of the aforementioned (1) statement,
- (5) aforementioned (1) - (4), wherein solid phase is the material containing silica or glass -- either -- a method of a statement,
- (6) aforementioned (1) - (5), wherein solid phase is glass fleece or glass membrane -- either -- a method of a statement,
- (7) aforementioned (1) - (5), wherein solid phase is a magnetic glass particle -- either -- a method of a statement,
- (8) A method of the aforementioned (7) statement, wherein a magnetic glass particle has an average diameter which are 0.5 micrometer - 5 micrometers,
- (9) A method the above (7) containing a magnetic body which has a diameter whose magnetic glass particle is 5-500 nm, or given in (8),
- (10) A method of the aforementioned (9) statement containing a magnetic body which has an average diameter whose magnetic glass particle is 23 nm,
- (11) aforementioned (7) - (10), wherein a magnetic glass particle is manufactured by a sol-gel method -- either -- a method of a statement,
- (12) Said sol-gel method.
- a) A process that a magnetic body is suspended in sol,
 - b) A process of hydrolyzing this sol and covering a magnetic body by gel,
 - c) a process of carrying out spray drying of the magnetic body covered by gel in a two nozzle spray dryer -- and
 - d) A process of sintering spray drying powder and forming glass for a magnetic body from wrap gel
- ******, a method of the aforementioned (11) statement,
- (13) Use of solid phase in a deamination process and/or a desulfonation process of a reaction that a cytosine base in nucleic acid is changed into an uracil base under existence of hydrogen sulfite ion,
- (14) Use of the aforementioned (13) statement which is the material in which solid phase contains silica or glass,
- (15) The above (13) whose solid phase is glass fleece or glass membrane, or use given in (14),
- (16) The above (13) whose solid phase is a magnetic glass particle, or use given in (14),

- (17) A kit for carrying out a hydrogensulfite reaction including a solution containing hydrogen sulfite ion and solid phase,
- (18) A kit of the aforementioned (17) statement which is a substance in which solid phase contains silica or glass,
- (19) The above (17) whose solid phase is glass fleece or glass membrane, or a kit given in (18),
- (20) In a kit the above (17) or given in (18) and a row whose solid phase is a magnetic glass particle
- (21) aforementioned [for a reaction from which a cytosine base in nucleic acid is changed into an uracil base under existence of hydrogen sulfite ion] (17) - (20) -- either -- use of a kit of a statement

It is alike and is related.

EFFECT OF THE INVENTION

[Effect of the Invention]

[0011]

It is suitable for the small-scale laboratory which can enforce the method by this invention easily with hand control, therefore cannot use an idiomatic analysis apparatus. Use of the solid phase which can be dealt with by an idiomatic analysis apparatus, and a division magnetism glass particle is advantageous at the large-scale laboratory which has a lot of sample throughput. In this invention, since it is combined on the surface of solid phase by various interactions which may influence a success of a hydrogensulfite reaction, the nucleic acid can carry out a hydrogensulfite reaction successfully with a satisfying form.

[Best Mode of Carrying Out the Invention]

[0012]

the problem discussed above -- the cytosine base in nucleic acid -- preferably, two or more cytosine bases -- an uracil base -- preferably, It is changed into two or more uracil bases, and a 5-methylcytosine base is not changed intentionally (a "hydrogensulfite reaction" or "hydrogensulfite processing"), It is solved by providing the method by which nucleic acid is combined with solid phase between the deamination process of a hydrogensulfite reaction, and/or a desulfonation process by that cause. Preferably, solid phase is glass fleece, glass membrane, or a magnetic glass particle. Furthermore, this invention indicates the kit containing the solid phase and reagent for carrying out the use and the hydrogensulfite reaction of solid phase in the deamination process and/or desulfonation process of a hydrogensulfite reaction.

[0013]

Use of the solid phase in a desulfonation process has preferably the advantage between the deamination process of a hydrogensulfite reaction, and/or a desulfonation process that handling can automate easily. For example, when using glass fleece for a deamination process and/or a desulfonation process, the DNA precipitation which time requires is not required, centrifugal separation can attain; uncombined separation easily, and the dead space of glass fleece can be disregarded, therefore a washing process is dramatically effective. This is advantageous when potential inhibitor uses hydrogensulfite processing DNA for PCR which can reduce susceptibility intentionally. It is suitable for the small-scale laboratory which can enforce the

method by this invention easily with hand control, therefore cannot use an idiomatic analysis apparatus. Use of the solid phase which can be dealt with by an idiomatic analysis apparatus, and a division magnetism glass particle is advantageous at the large-scale laboratory which has a lot of sample throughput. In an idiomatic hydrogensulfite reaction, the denaturation conditions to which a hydrogensulfite can react only to the pyrimidine which does not participate in a base pairing are chosen. Therefore, since nucleic acid is combined on the surface of solid phase by various interactions which may influence a success of a hydrogensulfite reaction, it is a surprising thing that a hydrogensulfite reaction can be successfully carried out in a satisfying form by the method by this invention.

[0014]

A "hydrogensulfite method" [a "hydrogensulfite reaction", "hydrogensulfite processing", or] According to this invention, the becoming term, The cytosine base under existence of hydrogen sulfite ion and in nucleic acid and two or more cytosine bases especially are preferably changed into an uracil base or two or more bases, and a 5-methylcytosine base means preferably the reaction which is not changed intentionally. This reaction for detection of methylation cytosine is indicated in detail by Frommer et al. (above), Grigg, and Clark (above). The deamination process and the desulfonation process that a hydrogensulfite reaction may be performed separately or simultaneous are included (drawing 1; see Grigg and the Clark (above)). Description that a 5-methylcytosine base is not changed intentionally, Although it cannot eliminate that few 5-methylcytosine bases are changed into uracil, only the fact of a flume lie of meaning only a cytosine base (un-methylating) (un-methylating) changing a cytosine base exclusively is taken into consideration (Frommer et al., above).

[0015]

The method of this invention can be enforced in the combination of some of hydrogensulfite reactions and immobilization processes. In the first mode, while nucleic acid is combined with solid phase, a deamination process and a desulfonation process are performed. In therefore, the desirable mode of this invention

- a) The process of combining nucleic acid with solid phase,
- b) The process to which solid phase joint nucleic acid is incubated under existence of hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause,
- c) The process of washing deamination solid phase joint nucleic acid arbitrarily,
- d) The process which incubates deamination solid phase joint nucleic acid under alkali conditions that deamination nucleic acid is desulfonated by that cause,
- e) In the process and row which wash arbitrarily deamination desulfonation solid phase joint nucleic acid
- f) The process that deamination desulfonation nucleic acid is arbitrarily eluted from solid phase the cytosine base in ***** and nucleic acid -- desirable -- the uracil base of two or more cytosine bases -- thereby, the conversion ("hydrogensulfite reaction") to two or more uracil bases and the method from which a 5-methylcytosine base is not changed intentionally are indicated preferably.

[0016]

In the 2nd mode of this invention, a desulfonation process is performed, while nucleic acid is combined with solid phase. In therefore, another desirable mode of this invention

- a) The process to which nucleic acid is incubated under existence of hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause,
- b) The process of combining deamination nucleic acid with solid phase,

- c) The process of washing deamination solid phase joint nucleic acid arbitrarily,
- d) The process which incubates deamination solid phase joint nucleic acid under alkali conditions that deamination nucleic acid is desulfonated by that cause,
- e) In the process and row which wash arbitrarily deamination desulfonation solid phase joint nucleic acid
- f) The process that deamination desulfonation nucleic acid is arbitrarily eluted from solid phase Thereby, the conversion ("hydrogensulfite reaction") to the cytosine base in ***** and nucleic acid, the uracil base of two or more desirable cytosine bases, and two or more desirable uracil bases and the method from which a 5-methylcytosine base is not changed intentionally are indicated.

[0017]

In the 3rd mode of this invention, a deamination process is performed, while nucleic acid is combined with solid phase. In therefore, another desirable mode of this invention

- a) The process of combining nucleic acid with solid phase,
- b) The process to which solid phase joint nucleic acid is incubated under existence of hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause,
- c) The process of washing solid phase joint nucleic acid arbitrarily,
- d) The process that deamination nucleic acid is eluted from solid phase
- e) The process which incubates deamination nucleic acid under alkali conditions that deamination nucleic acid is desulfonated by that cause

Thereby, the conversion ("hydrogensulfite reaction") to the cytosine base in ***** and nucleic acid, the uracil base of two or more desirable cytosine bases, and two or more desirable uracil bases and the method from which a 5-methylcytosine base is not changed intentionally are indicated.

[0018]

The person skilled in the art knows how to carry out a hydrogensulfite reaction, by referring to Frommer et al. (above), Grigg, and Clark (above) which indicate the main parameters of a hydrogensulfite reaction, for example. It is publicly known to a person skilled in the art for the strange method of Grunau et al. (above) to a hydrogensulfite method to be possible. The incubation time to the parameter which influences deamination efficiency and DNA degradation, and the influence of temperature are indicated. When it summarizes, in a deamination process, pH is within the limits of acidity, using stabilizer like further reagent like alcohol, or hydroquinoline depending on the chaotropic agent and the case depending on the buffer solution containing hydrogen sulfite ion, and the case. From 0.1, the concentration of a hydrogensulfite is 6M hydrogensulfite and preferably, From 1M, are 5.5M and the concentration of the chaotropic agent, From 1, are 8M and preferably by that cause, Within the limits of acidity pH using a guanidinium salt preferably, It is 4.5 to 6.5, and 90 ** of temperature is 90 ** from a room temperature (25 **) preferably from 0 **, and reaction time is 24 hours from 1 hour preferably 24 hours, 48 hours, or more from 30 minutes. The solution in which a desulfonation process contains only hydroxide (for example, sodium hydroxide), for example, Or as a solution (for example, 38%EtOH, 100mM NaCl, 200mM NaOH) containing ethanol, sodium chloride, and sodium hydroxide, An alkaline solution or buffer solution is added, and it is a room temperature or carries out by incubating from 5 minutes preferably for 60 minutes several minutes at an elevated temperature.

[0019]

In the mode of this invention, it is a deoxyribonucleic acid (DNA), and nucleic acid is especially

found out by the genome of genomic DNA or nucleic acid, i.e., a living thing, and is DNA or the nucleic acid by which a passage is carried out to posterity as information required for survival. This term is used in order to distinguish from what is found out within DNA of another mold, for example, a plasmid. An eukaryon or prokaryotic cell nature may be sufficient as the supply source of nucleic acid, and a vertebrate especially mammalian, and the thing that originates in an animal or *Homo sapiens* most preferably may be preferably sufficient as it.

[0020]

In the mode of this invention, nucleic acid is combined with solid phase, solid phase is not embellished, i.e., nucleic acid is coupled directly without the compound which carries the combination to solid phase. Nucleic acid is combined with the non-modified surface of solid phase, solid phase contains a hole by that cause, and the combination to the surface also takes that nucleic acid may be combined with the surface in the hole of solid phase into consideration. The ionic exchanger which solid phase has the non-modified surface preferably in the mode by this invention, and can combine nucleic acid under specific conditions () [Amersham Biosciences Europe and] The material containing the hydroxyl apatite (marketed from Sigma, Taufkirchen, and Germany) and glass which are marketed from Freiburg and Germany, silica, glass, or silica may be sufficient. solid phase being embellished with another mode, namely, solid phase, The arrangement of the nucleic acid to the streptoavidin (it has adhered on the surface of solid phase) combined with the oligonucleotide or biotin sign DNA adhering to the surface combines nucleic acid indirectly by specific combination, using the compound which carries the combination to solid phase. Therefore, suitable particles are marketed from DYNAL, Oslo, and Norway, for example, are indicated to WO90/064045.

[0021]

["non-modified"] The further chemical modification does not exist, i.e., the becoming term means not adhering to other chemical groups in covalent bond or in noncovalent bond. A "non-modified glass surface" [the "non-modified surface", a "non-modified silica surface", or] the becoming term, It means that other chemical groups with which the silica surface itself is provided as an intermediate product for nucleic acid combination which has not been combined have not adhered in covalent bond or in noncovalent bond by nucleic acid combining with an intermediate product. Therefore, nucleic acid is preferably coupled directly with the "non-modified surface" with a hydrogen bond and another atomic power. the example of the surface embellished -- arrangement -- it is the silica surface where the oligonucleotide which combines a nucleic acid molecule with a specific form has adhered. Another example about the embellished silica surface is the silica surface by which the coat was carried out by the streptoavidin combined with the biotinylated DNA molecule.

[0022]

In the specific desirable mode by this invention, solid phase, They are other substances covered with the material, for example, glass fiber, containing the glass or silica which has the non-modified (glass or silica) surface preferably or diatomaceous earth, a glass bead or particles, glass membrane, the magnetic glass particle, or the non-modified glass surface. Glass fleece, glass membrane, or a magnetic glass particle is especially preferred. This solid phase is indicated, for example in European patent No. 0389063 or U.S. Pat. No. 5234809.

[0023]

The conditions which combine DNA or nucleic acid to glass or a silica surface are fundamentally publicly known to a person skilled in the art. This method is indicated in detail in various articles. In Vogelstein, B. and Gillespie, D., and Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:615-619 (1979).

For example, the method of combining the nucleic acid of agarose gel origin to polish flint glass is shown under existence of sodium iodide. Refining of the plasmid DNA of bacteria origin under existence of sodium perchlorate and on glass powder is indicated to Marko, M.A. et al., and Anal. Biochem.121:382-387 (1982). Isolation of single strand M13 phage DNA on the glass fiber filter by precipitating a phage particle using acetic acid and the dissolution of the phage particle in a perchlorate are indicated by DE-A 3734442. The nucleic acid combined with the glass fiber filter is washed, and, subsequently it is eluted with methanol content Tris/EDTA buffer solution. The similar procedure for refining DNA from lambda phage is indicated to Jakobi, R. et al., and Anal. Biochem.175:196-201 (1988). A procedure needs separation of the nucleic acid from the selective binding and the impurity, for example, agarose, protein, or the cell residue to the glass surface of nucleic acid among KAOTORO pick salting in liquid. In order to separate a glass particle from impurity, particles are centrifuged or a fluid may be sampled through a glass fiber filter. However, that this uses the procedure for processing a lot of samples is a restrictive process barred. In the desirable mode of this invention, as indicated, for example to Alderton, R.P. et al., and Anal. Biochem.201:166-169 (1992), and PCT GB91/00212, After making it precipitate by adding a salt and ethanol, nucleic acid is combined using a magnetic glass particle.

[0024]

In the very desirable mode of this invention, solid phase is a magnetic glass particle which has a non-modified glass surface preferably. A magnetic glass particle is a solid dispersed matter of the small magnetic nucleus in glass, namely, this is a glass glob in which the very small magnetic object is distributed. This object called a magnetic body is drawn into a magnet, i.e., Felix, ferromagnetism, or superparamagnetism material. Since a paramagnetism substance is not drawn in a very weak comb to a magnet, it is not useful, and this [its] is not enough for the method by this invention. Felix or the ferromagnetic material when especially not being front-magnetized yet is preferred. In this aspect of affairs, it is understood that it means that pre-magnetization makes the magnet to which remnant magnetization is made to increase contact. a desirable magnetic material -- iron, iron oxide (Fe_3O_4), for example, magnetite, or Fe_2O_3 -- it is gamma- Fe_2O_3 preferably. In principle, Felix of a barium ferrite, nickel, cobalt, an aluminum-nickel-Fe-Co alloy, or others or a ferromagnetic material can be used. It divides by this invention and the magnetic glass particle indicated to WO96/41811, WO00/32762, and WO01/37291 is preferred.

[0025]

In the very desirable mode of this invention, since iron is inhibitor of the continuing amplification reaction, i.e., iron is enzyme inhibitor, a magnetic glass particle has low iron corrosion. Therefore, this is the important feature of a magnetic glass particle. Preferably, the iron corrosion (for 20 minutes) in water or 1M HCl is less than 40 ppm, more preferably less than 20 ppm, and most preferably less than 10 ppm. In the most desirable mode of this invention, the magnetic glass particle is indicated to international patent application WO01/37291, and this is marketed by the MagNA Pure LC DNA isolation kit I (Roche, Mannheim, Germany). These particles can precipitate slowly, therefore can be advantageously used in the automated method by this invention. The generation is summarized below.

[0026]

A magnetic glass particle is a globular form substantially, and a diameter is small and contains at least one 500-nm magnetic body from the diameter 5. This has a surprising result in a precipitate moving state, and is quantified more, without the value of the half line which is a time span until it precipitates from the element of the capacity with specific 50% of particles, and $t_{1/2}$. The half-

life about precipitate of the 3mg [/ml] weight / capacity suspension of MGP which has a non-modified glass surface of this invention in the inside of isopropanol exceeds 6 minutes more preferably for 4 minutes for 3 minutes. However, the most desirable value about half-life exceeds 10 minutes or 20 more minutes. Magnetic coloring matter may be sufficient as the most desirable magnetic body of MGP, for example. 500 nm of sizes [200 nm of] of a magnetic body are 15 to 50 nm most preferably from 10 in the nano-scale range, i.e., 5. Suitable magnetic coloring matter is manufactured by CERAC and is 23 nm in average diameter, And gamma-Fe₂O₃ is comprised (BET surface 50m²/g, CERAC-.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178, USA; product number I-2012). The most desirable magnetic glass particle by this invention, When MGP is measured by a high resolution scan nature electron microscope, from 0.5 micrometer, 5 micrometers, have a 1 to 2-micrometer particle diameter preferably, and, on the other hand, a magnetic body, As described above, 500 nm is further characterized from 5 according to the fact of having 200 nm of diameters of the range of 15 to 50 nm most preferably from 10. Therefore, when are measured by a high resolution scan nature electron microscope, and the diameter ratio to the magnetic glass particle of a magnetic coloring matter core is 1:10 or less, MGP is characterized further. Although most desirable MGP is microporosity, it has the comparatively large surface which is structurized highly, therefore exceeds 6-m²/g. desirable -- a magnetic glass particle -- 100m²/g from 5 -- desirable -- 90m²/g from 5 -- more -- desirable -- 50m²/g from 10 -- it has the surface area of the range of 15 to 30-m²/g most preferably. This can be determined by the Brauner-Emett-Teller method using the device of automated marketing. Please refer to Brauner, "The Absorption of Gases and Vapors" (1943), and Princeton University Press for the so-called argument of this method and a BET adsorption method.

[0027]

The magnetic glass particle used by this invention may be intrinsically provided by different formula indicated to WO01/37291. With the gestalt of a tablet, this can be preferably provided as suspension as powder. In the desirable mode of this invention, such suspension contains the magnetism glass particle (MGP) of 60mg/ml from 5. In another mode of this invention, silica content material is suspended to the buffer solution which may contain preferably 8 mol/l. of chaotropic agent by 4 to the concentration of 6 mol/l. from 2 depending on the case. A KAOTORO pick salt is sodium iodide, sodium perchlorate, thiocyanic acid guanidinium, isothiocyanic acid guanidinium, or chloride guanidinium. The chaotropic agent by this invention changes arrangement of a regular structure of the water of a fluid, and is arbitrary chemicals which have an effect which DNA or RNA combines with MGP of this invention when it exists in the solution in which this ** contains DNA or RNA. Another compound publicly known to a person skilled in the art is also possible.

[0028]

In the desirable mode of this invention, it is manufactured by the sol gel process indicated to WO01/37291, WO00/37291, and WO96/41811, and a magnetic glass particle is especially a sol gel process. :

- Process that a magnetic body is suspended in sol;
 - Process of hydrolyzing sol and covering a magnetic body with gel;
 - process; which carries out spray drying of the magnetic body covered with gel with 2 nozzle spraying dryer -- and
 - Process of forming glass from the gel which sinters the powder which carried out spray drying and covers a magnetic body;
- *****.

[0029]

Desirable MGP of this invention is the magnetic glass particle manufactured according to Example 8 of WO00/32762 which contains MIKURONA Matt Black as magnetic coloring matter. Most desirable MGP of this invention is manufactured according to international patent application WO01/37291, and this is provided also the MagNA Pure LC DNA isolation kit I (Roche, Mannheim, Germany). This is generated by the sol gel process indicated to international patent application WO01/37291 again using a magnetic body about 23 nm in diameter, or coloring matter ($\text{gamma-Fe}_2\text{O}_3$ is comprised and). The product made from CERAC, CERAC :P .O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178, USA; product number I-2012. After covering a magnetic body to gel, a slurry is sprayed through 2 liquid nozzles and powder is produced. A suitable spray drying system Nubilosa Molekularzerstoubung, . Are produced by Ladish GmbH & Co. KG, Konstanz, and Germany. For example, it is produced by "Labor-Zerstoubungstrockner (LTK type)" or Buchi AG, Uster, and Switzerland, for example, is produced by Mini Spray Dryer (B-191 type). 1:10 or less, since the diameter ratio to the glass shell of a magnetic nucleus is 1:10 to 1:1000 preferably, although the geometry and the number of the incorporated magnetic nucleus or its inert carriers do not determine the shape and the size of particles, it determines manufacturing conditions and the conditions under division spray drying. If it puts in another way, selections of the pressure between spray drying procedures, inlet temperature, outlet temperature, and the rate of flow are size distribution and flexibility which determines the shape of a glass drop, and, thereby, embellish MGP. Therefore, the nozzle of the spray drying system is heated. inlet temperature -- for 120 to 500 ** -- desirable -- for 150 to [170 ** to 230 **, or] 230 ** -- most -- desirable -- for 190 to [150 ** to 200 **, or] 210 ** -- or it is 200 ** or is slightly lower than it. Even if outlet temperature exceeds the boiling point of a solvent by the boiling point of sol, and it depending on a solvent and it is equivalent to it, it may be low less than 10 ** slightly. When using ethanol as a solvent, 150 ** 300 ** is 80 ** to 110 ** most preferably in 70 ** from 50 **. The optimal temperature is 90 ** to 100 **. Nozzle pressure exceeds 3 bars and is preferably controlled by 4 to 6 bars. The fact of depending for an exact parameter on the spray drying system to be used will be understood by the engineer. however, an engineer -- instruction of this invention -- either -- it can move to another spray drying system, and a parameter can be found out by taking the indication of this invention into consideration. For another setting out, the method of finding out which parameter should be chosen can be drawn by the formula indicated to Masters: "Spray Drying Handbook" (1991), John Wiley & Sons, and New York. Preferably, it will ask about the manual of a spray drying system, or the spray drying system manufacturer's technical service will be connected with. In order to optimize a yield, baking tightness or sintering temperature is high as much as possible, namely, should be slightly made lower than a melting range. An exact temperature is for 400 to 1200 **, although it is dependent on glass composition. In the case of EJ glass composition indicated to WO01/37291, 770 ** of sintering temperature is about 750 ** preferably from 720 **. When taking instruction of this invention into consideration, the technical range of an engineer finds out the temperature about each glass composition. Henceforth, powder may be heated to 200 ** for 1 hour, and it may cool to a room temperature depending on the case, and heats to 750 ** (baking tightness or sintering temperature) by a part for heating rate/of 1K under nitrogen environment, and the temperature is maintained for 1 hour. Subsequently, a furnace is cooled to 150 ** and it heats to 200 ** again among the air for 1 hour. After cooling to a room temperature, it moves for brandishing powder (50 micrometers), and screens for 30 minutes. Bottling of the screened sample is carried out, and at 200 **, it sterilizes for 4 hours and,

subsequently cools to 80 **. Subsequently, a glass solution is taken from oven, and sterilization foil covers and closes.

[0030]

(Preferably magnetic glass particle) The experiment procedure for combination of non-modified glass or the nucleic acid to a silica surface can be indicated in detail below. 8 mol/l. of the procedure reaches from 1, and is preferably carried out under existence of a KAOTORO pick salt with a concentration of 6 mol/l. from 2. Sodium iodide, sodium perchlorate, thiocyanic acid guanidinium, isothiocyanic acid guanidinium, or chloride guanidinium may be sufficient as a KAOTORO pick salt. The chaotropic agent by this invention is arbitrary chemicals which have an effect which DNA (or RNA) combines with a magnetic glass particle, when arrangement of a regular structure of the water of a fluid is changed and this ** exists in a DNA (or RNA) content solution. Another publicly known biological substance also exists in a person skilled in the art. Another substance is also possible. enough to add the glass bead which has a non-modified glass surface to a mixture, and for combination arise, in order to combine the mixture of another biological compound depending on nucleic acid and the case -- time incubation is carried out. The specialist usually has full knowledge of the time of an incubation process. When it differs, this process can be optimized by determining the quantity of the nucleic acid currently fixed to the surface. The incubation time for 30 minutes is suitable for nucleic acid from 10 seconds. Subsequently, the reagent for carrying out the process from which a hydrogensulfite reaction differs is added (or it may exist from before). Nucleic acid is separated from a fluid after an incubation or washing. When this is convenient for the nucleic acid generally combined with gravity or a magnetic glass particle, it can attain by separating the nucleic acid combined with the magnetic glass particle by applying a magnetic field. For example, a magnetic particle can be drawn on the wall surface of the container which performed the incubation. Subsequently, the fluid containing the biological compound or reaction component which was not combined with a magnetic particle is removable. It depends for the removal procedure of using on the mold of the container which performed the incubation. As a suitable process, removal of the fluid by pipetting or suction is mentioned. Subsequently, the mixture ("70% ethanol") or the acid washing solution of ethanol 70 part by volume and water 30 part by volume can wash preferably the material containing united nucleic acid once [at least] so that it may be indicated to WO99/40098. Although isolation from the material-list side of nucleic acid and target nucleic acid is not caused, the washing solution which flushes the impurity which is not desirable as thoroughly as possible is used. This washing process is performed by incubating the glass or silica which contains united nucleic acid preferably. Preferably, material is re-suspended in this process. It removes like the joint process which described above preferably only the washing solution with which it was contaminated. After the last washing process, under decompression of material, it can be made to be able to dry easily or a fluid can be evaporated. The head end process using acetone may be carried out.

[0031]

In the mode of this invention, nucleic acid is got from a biological sample by the solid phase and person skilled in the art of this invention using a publicly known method. A biological sample The cell from a multicellular organism (for example, Homo sapiens and an animal cell) (for example, leucocytes), And low [activity] and a high-polymer-chemistry compound (for example, hapten, an antigen, an antibody and nucleic acid, plasma, cerebrospinal fluid, expectoration, facilities, a biopsy specimen, bone marrow, a mouthwash, a blood serum, an organization, urine, or its mixture) are included immunologically. In the desirable mode of this

invention, a biological sample is a fluid of *Homo sapiens* or moving object origin. Preferably, a biological sample is blood, plasma, a blood serum, or urine. Plasma is EDTA treatment, heparin processing, or the plasma that carried out citric treatment preferably. The biological sample containing nucleic acid is dissolved and the mixture of the biological compound containing the ingredient of nucleic acid and others is made. Publicly known to an engineer, the procedure of dissolving a biological sample is intrinsically chemical, enzymatic, or physical, and is acquired. The combination of these procedures is applicable similarly. For example, the dissolution may be carried out using an ultrasonic wave, high voltage, shearing force, alkali, a surface-active agent, a KAOTORO pick physiological saline solution, protease, or lipase. About the dissolution procedure for obtaining, nucleic acid detailed reference, Sambrook et al.; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, The 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, It is made by Cold Spring Harbor, NY and Ausubel; Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, and NY. Subsequently, nucleic acid is isolated from a dissolution mixture using the method and solid phase of this invention, ranks second, and the method of this invention, i.e., hydrogensulfite processing of this invention, may be presented with it. Using the chaotropic agent again, a cell is dissolved and a mixture is prepared between nucleic acid and other biological substances (for example, refer to Sambrook et al. (1989) and EP0389063). Then, the material containing glass or silica is added and the refining effects are acquired from the action which DNA or RNA combines with the material which has a glass surface under these conditions, i.e., existence of the chaotropic agent of specific concentration and a more high-concentration organic solvent, or acid conditions. Therefore, the nucleic acid in which this invention was isolated from the mixture of nucleic acid and other biological substances also in consideration of the combination of a melting process and a hydrogensulfite reaction again, Hydrogensulfite processing is presented directly and, thereby, nucleic acid is combined by solid phase in a deamination process and/or a desulfonation process. In details, more the cytosine base in nucleic acid, and two or more desirable cytosine bases An uracil base, Change into two or more desirable uracil bases, it is provided by the method (a "hydrogensulfite reaction" or "hydrogensulfite processing") from which a 5-methylcytosine base is not changed intentionally preferably by that cause, and by that cause, By combining with solid phase and the material which contains glass or silica preferably, nucleic acid is isolated from the mixture containing nucleic acid and a biological compound, and is combined with solid phase between the deamination process of a hydrogensulfite reaction, and/or a desulfonation process. further in detail, nucleic acid is isolated from the mixture of nucleic acid and other biological compounds, and the method combined with solid phase between the deamination process of a hydrogensulfite reaction and/or the desulfonation process is provided -- namely

- a) Process of providing the mixture of nucleic acid and other biological compounds;
- b) Process of combining nucleic acid with solid phase, and removing other biological compounds arbitrarily, and washing solid phase joint nucleic acid arbitrarily;
- c) Process to which solid phase joint nucleic acid is incubated under existence of hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause;
- d) Process of washing the solid phase joint nucleic acid by which deamination was carried out arbitrarily;
- e) Process that the nucleic acid by which incubated the solid phase joint nucleic acid by which deamination was carried out, and deamination was carried out by that cause under alkali conditions is desulfonated;
- f) The process of deamination being arbitrarily carried out and washing the desulfonated solid

phase joint nucleic acid; in a row

g) The process that deamination is arbitrarily carried out and the desulfonated nucleic acid is eluted from solid phase

The method (a "hydrogensulfite reaction" or "hydrogensulfite processing") which changes the cytosine base in an implication and nucleic acid and two or more desirable cytosine bases into an uracil base and two or more desirable uracil bases and from which a 5-methylcytosine base is not changed intentionally preferably by that cause is provided.

[0032]

in another mode, nucleic acid is isolated from the mixture of nucleic acid and other biological compounds, and the method combined with solid phase between the desulfonation processes of a hydrogensulfite reaction is provided -- namely

a) Process of providing the mixture of nucleic acid and other biological compounds;

b) Process that combines nucleic acid with solid phase, removes other biological compounds arbitrarily, and wash solid phase joint nucleic acid arbitrarily, and nucleic acid is eluted from solid phase;

c) Process to which the nucleic acid in which it was eluted is incubated under existence of hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause;

d) Process of combining with solid phase the nucleic acid by which deamination was carried out;

e) Process of washing the solid phase joint nucleic acid by which deamination was carried out arbitrarily;

f) Process that the nucleic acid by which incubated the solid phase joint nucleic acid by which deamination was carried out, and deamination was carried out by that cause under alkali conditions is desulfonated;

g) The process of deamination being arbitrarily carried out and washing the desulfonated solid phase joint nucleic acid; in a row

h) Process that deamination is arbitrarily carried out and the desulfonated nucleic acid is eluted from solid phase;

The method (a "hydrogensulfite reaction" or "hydrogensulfite processing") which changes the cytosine base in an implication and nucleic acid and two or more desirable cytosine bases into an uracil base and two or more desirable uracil bases and from which a 5-methylcytosine base is not changed intentionally preferably by that cause is provided.

[0033]

in another mode of this invention, nucleic acid is isolated from the mixture of nucleic acid and other biological compounds, and the method combined with solid phase between the deamination processes of a hydrogensulfite reaction is provided -- namely

a) Process of providing the mixture of nucleic acid and other biological compounds;

b) Process of combining nucleic acid with solid phase, and removing other biological compounds arbitrarily, and washing solid phase joint nucleic acid arbitrarily;

c) Process to which solid phase joint nucleic acid is incubated under existence of hydrogen sulfite ion, and the deamination of the nucleic acid is carried out by that cause;

d) Process of washing solid phase joint nucleic acid arbitrarily;

e) Process that the nucleic acid by which deamination was carried out is eluted from solid phase;

f) Process that the nucleic acid by which incubated the nucleic acid by which deamination was carried out and deamination was carried out by that cause under alkali conditions is desulfonated;

The cytosine base in an implication and nucleic acid and two or more desirable cytosine bases are changed into an uracil base and two or more desirable uracil bases, and, thereby, the method

(a "hydrogensulfite reaction" or "hydrogensulfite processing") from which a 5-methylcytosine base is not changed intentionally is provided preferably.

[0034]

The desirable method of this invention includes the process that joint nucleic acid is further eluted from solid phase. Subsequently, this nucleic acid may be amplified, for example. In order to be eluted, the material containing glass (it has a non-modified silica surface) or silica is re-suspended in the solution which does not contain the chaotropic agent and/or an organic solvent at all, or contains only the amount of low. Or suspension may be diluted with the solution which does not contain the chaotropic agent and/or an organic solvent at all, or contains only the amount of low. The buffer solution of this characteristic is publicly known from DE3724442, and Jakobi et al. (above). The elution buffer with a low salt content is buffer solution which especially has a content of less than 0.2 mol/l. In an especially desirable mode, an elution buffer contains a Tris substance and the Tris buffer solution which has pH especially exceeding about 7 or 7 for the purpose of a buffer. In another specific mode, an elution buffer is demineralized water. The solution containing nucleic acid is ready for being used for an amplification reaction here, after solid phase is removed. Therefore, nucleic acid is moved to the new reaction tube containing all the reagents required for amplification. Arbitrarily, the solution containing all the reagents required for amplification is added by the suspension of solid phase and discharge nucleic acid. In another mode, the solution containing all the reagents required for amplification is added without an elution process to the suspension of solid phase and joint nucleic acid, and, thereby, amplification of the nucleic acid on solid phase is carried out.

[0035]

According to this invention, for washing and a joint process preferably, the bottom of the conditions in which the method in molecular biology and the fluid which especially fitted the deoxyribonucleic acid (DNA) or the ribonucleic acid (RNA) refining method are used that these methods are specific -- the solid phase of these substances -- especially -- silica or a glass surface -- further especially the combination to a magnetic glass particle is used. A desirable fluid contains the arbitrary mixtures of alcohol and/or ketone or it, and water. As alcohol used for this invention, the 1st class, the 2nd class, or tertiary alcohol of general formula R-OH (R means general formula-(-CH₂)_n-CH₃ (n>=0) among a formula) is mentioned preferably. However, when suitable for the molecular biological purpose, other alcohol, for example, glycerol, may be used. Especially a suitable thing is a mixture of alcohols, isopropanol, ethanol or it, and water, and is a mixture of isopropanol 80 part by volume and water 20 part by volume preferably. In another mode of this invention, a fluid contains ketone, for example, acetone. Suitable buffer solution solution is used. A buffer solution system suitable for the molecular biological purpose Sambrook, J. et al. "Molecular Cloning and A Laboratory Manual (1989)", J. It can find out in the volume Sambrook, E.F. Fritsch, and on T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, and NY. A desirable buffer solution substance is Tris-hydroxymethylamine (TRIS), phosphate, and N-(2-hydroxy ethyl) piperazine N'- (2-ethane sulfonic acid) (HEPES), its salt, or other suitable substances. The substance to which the ionic strength of a solution is changed, for example, NaCl, KCl, CaCl₂, a metallic cation complexing agent (EDTA), for example, ethylenediaminetetraacetic acid, or its salt may exist.

[0036]

In the desirable mode of this invention, nucleic acid is amplified by polymerase chain reaction (PCR;EP0201184, EP-A-0 200362, U.S. Pat. No. 4683202). an amplification method -- again -- a ligase chain reaction (LCR, Wu, D.Y. and Wallace, and R.B.) Genomics 4:560-569 (1989) and

Barany, F., Proc -- a .Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193(1991); polymerase ligase chain reaction (Barany and F..) PCR Methods Appl.1:5-16(1991); gap LCR (PCT patent publication number WO90/01069); A restoration chain reaction (European patent publication number EP439182A2), 3SRs (Kwoh, D.Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177(1989);Guatelli, J.C. et al..) Proc. Natl. Acad. Sci. USA87:1874-1878 (1990) ;P CT patent publication number WO92/0880A, and NASBA (U.S. Pat. No. 5130238) may be sufficient. Chain substitution amplification (SDA), transfer medium amplification (TMA), and Qbeta-amplification (about an outline) For example, Whelen, A.C. and Persing, D.H., There is Annu.Rev.Microbiol.50:349-373(1996);Abramson, R.D. and Myers, T.W., and Curr.Opin.Biotechnol.4:41 -47 (1993) reference. . Especially the amplification method of desirable this invention is indicated by U.S. Pat. No. 5786146. It is the methylation specific PCR method (MSP) which combined hydrogensulfite processing and allele specific PCR (for example, refer to U.S. Pat. No. 5137806, U.S. Pat. No. 5595890, and U.S. Pat. No. 5639611).

[0037]

In a desirable mode, a method becomes unable to include the process of detecting the nucleic acid amplified further. It is publicly known to a person skilled in the art, and For example,;Molecular Cloning, Sambrook et al., Cold Spring Harbor University Press (1989), The volume Lottspeich and Zorbas, and on "Bioanalytik" L.a.Zorbas, Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany, Or Ausubel, F. et al., "Current Protocols in Molecular Biology" (1994)", F. Ausubel, R.Brent, and K -- the nucleic acid amplified by the standard analytical method indicated to the volume on R.E., Wiley & Sons Verlag, and New York can be determined or detected. Before detecting target nucleic acid, another purification process, for example, a precipitation process, is. As a non-limiting example, it intercalates in a detecting method at double stranded DNA, and a specific color like the ethidium bromide to which the subsequent fluorescence is changed may be made to combine or intercalate. It can dissociate with an electrophoresis method and the refined nucleic acid can also be visualized after that, after carrying out restriction digestion arbitrarily. There is also assay of the probe base using the hybridization of an oligonucleotide to a specific sequence and detection of the hybrid following it. Sequencing of the target nucleic acid can also be carried out to a person skilled in the art after another publicly known process. It applies to the silicon chip with which the specific probe has combined various nucleic acid sequences with the option, and a signal is generated when a complementary sequence joins together.

[0038]

In the especially desirable mode of this invention, nucleic acid is detected by measuring the fluorescence intensity under amplification. This method needs to carry out monitor observation of the fluorescence in real time. Especially the desirable method of using amplification and detection simultaneously by measuring fluorescence intensity, It is the TaqMan (registered trademark) method indicated by WO92/02638 and corresponding U.S. Pat. No. 5,210,015, U.S. Pat. No. 5,804,375, and U.S. Pat. No. 5,487,972. This method generates a signal using the exonuclease activity of polymerase. Although arrangement complementary to the 2nd field of the oligonucleotide containing arrangement complementary to the field of target nucleic acid and the same target-nucleic-acid chain in detail is contained, The sign oligonucleotide and sample which do not include the nucleic acid sequence defined by the 1st oligonucleotide are contacted, Under hybridization conditions, detect nucleic acid by a method including producing the mixture of a double strand, and here a double strand, The target nucleic acid which is carrying out annealing to the 1st oligonucleotide and sign oligonucleotide so that the three-dash terminal of the 1st

oligonucleotide may adjoin the five prime end of a sign oligonucleotide is included. Subsequently, under sufficient conditions to permit 3' nuclease activity from 5' of polymerase, this mixture is processed by the mold dependency nucleic acid polymerase which has 3' nuclease activity, the oligonucleotide by which annealing was carried out and the sign was carried out is cut from 5', and sign fragmentation is separated. The signal by which it was generated by hydrolysis of the sign oligonucleotide is detected and/or measured. The necessity for the reaction complex combined with solid phase which is formed of TaqMan (registered trademark) art and becomes detectable is eliminated. More generally the amplification and/or the detection reaction of a method by this invention are homogeneous solution phase assay. A still more desirable method is a form used with a LightCycler (registered trademark) device (for example, refer to U.S. Pat. No. 6174670). or [that especially desirable one is accompanied by the methylation specific primers under hydrogensulfite processing and existence of a methylation specific probe] -- or it is use of the amplification by which it is not accompanied, and the real-time fluorescence detection indicated to U.S. Pat. No. 6331393.

[0039]

In the desirable mode of this invention, a method is automated, namely, an automatable method which is indicated for example, to WO99/16781 is enforced. An automatable method means being suitable for carrying out by the device or machinery which there is [almost or] no external control or influence of the method according [a process] to Homo sapiens, and can operate. The automated method means carrying out by the device or machinery which there is [almost or] no external control or influence of an automatable method according [a process] to Homo sapiens, and can operate. For example, only the preliminary process of a method must be performed by hand control, a storage container must be filled up with and arranged and operation of another publicly known process, for example, a control computer, must be given to selection and the person skilled in the art of a sample by Homo sapiens. A device or the machinery can add a fluid on an automatic target, can mix a sample, or can carry out an incubation process at specific temperature. Typically, this machinery or device is a robot controlled by the computer which executes the program as which a single process and command are specified. In the desirable mode of this invention, the method automated with the high-speed extensive processing form with which a method is a high-speed extensive processing form, namely, a method and the machinery to be used, or a device means being optimized about a lot of samples for a short time is performed.

[0040]

In the diagnosis about Homo sapiens or the existence of a still more specific methylation pattern for the organization from a moving object, or screening of a fluid since it is living thing analysis for diagnostic analysis, the method by this invention is used preferably. The speed, accuracy, or susceptibility of detection like the methylation part in nucleic acid is reinforced using the method by this invention.

[0041]

In a desirable mode, under existence of hydrogen sulfite ion, preferably, this invention intentionally, a 5-methylcytosine base without being changed, The cytosine base in nucleic acid and two or more desirable cytosine bases are related with use of the solid phase in the deamination and/or desulfonation process of a reaction ("hydrogensulfite reaction") which are changed into an uracil base and two or more desirable uracil bases. In a desirable mode, under existence of hydrogen sulfite ion, preferably, this invention intentionally, a 5-methylcytosine base without being changed, The cytosine base in nucleic acid and two or more desirable

cytosine bases are related with use of the solid phase in the deamination and/or desulfonation process of a reaction ("hydrogensulfite reaction") which are changed into an uracil base and two or more desirable uracil bases. Furthermore it divides, and this combines nucleic acid between the deamination of a hydrogensulfite reaction, and/or a desulfonation process using solid phase, namely, it means that nucleic acid is combined with solid phase between the deamination of a hydrogensulfite reaction, and/or a desulfonation process. Preferably, solid phase is a substance containing silica or glass. Solid phase is glass fleece or glass membrane most preferably. In the most desirable mode, solid phase is a magnetic glass particle.

[0042]

In another desirable mode, this invention relates to the kit for carrying out the hydrogensulfite reaction containing a solution including hydrogen sulfite ion and solid phase. In a desirable mode, solid phase is a substance containing silica or glass. In a more desirable mode, solid phase is glass fleece or glass membrane. In the most desirable mode, solid phase is a magnetic glass particle. In another mode of this invention, the kit which comprises the part containing the stock solution containing the magnetic glass particle by this invention or its suspended solid is provided. The plastic in which this publicly known kit may be further used between hydrogensulfite procedures by a technical field, For example, the reaction tube manufactured by the microtiter plate or Eppendorf of a 96 or 384 well form, Hamburg, and Germany is included. A kit may come further to contain solid phase and the washing solution which especially fitted the washing process of glass fleece, a film, or a magnetic glass particle. A washing solution is provided as a stock solution which must often be diluted before use. A kit may come to contain the solution, the buffer (for example, TE, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0), or the pure water for DNA or RNA further combined with the eluting agent, i.e., solid phase, being eluted.

Another reagent containing a buffer suitable for use by this invention may exist. Preferably, under existence of hydrogen sulfite ion, the kit by this invention is used for the reaction from which the cytosine base in nucleic acid and two or more desirable cytosine bases are changed into an uracil base and two or more desirable uracil bases without changing a 5-methylcytosine base intentionally.

[0043]

The following examples, reference, and a drawing are provided in order to help an understanding of the true range shown by the claim of attachment of this invention. It is understood that it can embellish for the shown procedure, without deviating from the pneuma of this invention.

EXAMPLE

[Example]

[0044]

1.1 EXAMPLE

1. Example 1 : establishment of LC-PCR specific to hydrogensulfite processing DNA

1.1 Generalities

A hydrogensulfite reaction acts and the fact of changing non-methylating cytosine into uracil, . Polymerase chain reaction proves and non-methylating cytosine uses a specific primer for the field of the nucleic acid sequence changed into uracil here. That is, the adenine base of the primer faces uracil which is a hydrogensulfite resultant from non-methylating cytosine. Since there is cytosine which does not carry out an association to the adenine base of a primer in

imperfect conversion, a primer cannot be hybridized to this field. This has the effect that PCR output is acquired.

[0045]

How to have been improved for carrying out quick polymerase chain reaction is indicated by U.S. Pat. No. 6,174,670, and is used with a LightCycler (registered trademark) device (Roche, Mannheim, Germany). this method -- two sign probes -- amplification -- it can approach to the neighborhood with an anaclitic form, and two signs can perform fluorescent energy transfer (FRET) now. The quantity of the amplification thing by it is correlated with the intensity of the radiated light of specific wavelength. therefore, the thing (for example, -- being related with the overall-length arrangement and the promotor of this gene -- array number:1 and U.S. Pat. No. 5552277.) for which the promoterregion of a glutathione S-transferase pi gene is analyzed using a suitable probe and primer the Genbank deposition number M24485 and Morrow et al., and Gene75:3-11 (1989) -- reference -- it can be analyzed whether perfect conversion of non-methylating cytosine is obtained using this specific PCR method. However, the person skilled in the art knows that an option can be used like this evaluation. It seems that fluorometry is normalized by breaking by the first fluorometry obtained in the cycle in early stages of a reaction, i.e., background fluorescence, and the fluorometry between cycles is relatively constant on the other hand. The number of cycles chosen as the first fluorometry is the same about all the reactions compared, and it is shown that all the measurement increases relatively to the same reaction cycle. In the initial cycle of polymerase chain reaction amplification, the number of target molecules Geometric equation: $N_i = N_0 \times (1+E)^i$, The number of target molecules in the starting point of N_0 = reaction, the number of target molecules at the time of completion of the cycle of eye nickel= i watch, and E = amplification efficiency ($0 < E < 1$) can indicate here. The number of cycles required to reach a specific threshold (C_T value or a crossing) is in inverse proportion to the logarithm of $(1+E)$ between the genome growth phases of this amplification. Therefore, C_T value shows the measure of the reaction efficiency which enables comparison during a reaction. The fall of C_T value which means that a reaction reaches a threshold in fewer cycles shows increase of reaction efficiency. Since monitor observation of the increase of amplification products is carried out by measuring increase of the fluorescence under reaction, C_T is defined by this specification as the number of amplification cycles carried out by the time fluorescence exceeded arbitrary fluorescence levels (AFL). Although AFL was chosen near the fluorescent group bottom level, the range of change of the measured random fluorescence was exceeded, and the reaction moving state was measured between the geometric growth phases of amplification. Accumulation of the amplification products in a second-half cycle prevents a reaction, and actually leads it to a reaction plateau. AFL1.5 was chosen for the overall reaction. PCR amplification consists of a separate cycle, and typically, in one cycle, from less than AFL, the fluorescence measured by carrying out fluorometry once per cycle is boiled more highly than AFL, and increases. In order to improve measuring accuracy, on these specifications, the "exact" number of cycles which reaches the AFL threshold called C_T value or a crossing was computed by interpolating the fluorometry between cycles.

[0046]

1.2 General method

It is proved that the following experiments can use indicated PCR in the indicated LightCycler (registered trademark) device as evaluation methods of hydrogensulfite processing DNA. With the designed primer / probe combination, a positive result is obtained only by DNA after hydrogensulfite treatment. Using the same mold concentration (per PCR 20ng and 1ng), it was

parallel and hydrogensulfite processing DNA (in this case, hydrogensulfite DNA was processed according to the protocol indicated in the Example 2) and unsettled DNA were amplified.

[0047]

1.3 PCR analysis in LightCycler (registered trademark) device

1.3.1 Presentation of master mix

LS FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x, 2mM MgCl₂ and 0.5microM A forward primer and 0.5microM A reverse primer, a 250nM donor probe, and 250nM Acceptor probe and mold 10mul, total PCR capacity 20microl.

[0048]

1.3.2 PCR conditions

Denaturation 10 minutes/95 **

55 cycles 95 **/10 seconds

65 **/10 seconds - signal acquisition

72 **/10 seconds Ramp time 20 **/second

[0049]

1.4 Result

[Table 1]

MDNA / PCR	亜硫酸水素塩処理	C _T - 値または交差点
20 ng	あり	30.55 29.72 29.93 30.06
1 ng	あり	34.7 35.8 34.07 33.86
20 ng	なし	成長曲線なし 成長曲線なし 成長曲線なし 成長曲線なし
1 ng	なし	成長曲線なし 成長曲線なし 成長曲線なし 成長曲線なし

[0050]

A result shows the crossing only about DNA which carried out hydrogensulfite processing. Therefore, this PCR is suitable for evaluating a hydrogensulfite method. If it is guaranteed to a person skilled in the art that a primer / probe combination does not react to DNA before hydrogensulfite processing, it is clear to him whether which PCR is used as evaluation methods.

[0051]

2. Example 2 : hydrogensulfite reaction using magnetic glass particle (MGP)

2.1.1 Denaturation of DNA

Methylated DNA () [Intergen and] Serologicals Corporation, Norcross, GA, and USA -- offer; Cat S 7821 dilution (it spiked in the 30ng and 6 ng/hDNA 1000ng background --) [and] Roche catalog number 1691112; ten duplicate 100microl and 2M NaOH 12microl are mixed per concentration, and it incubates for 15 minutes at 37 **.

[0052]

2.1.2 Deamination of DNA

Denatured DNA The mixture of the 112microl is carried out to 200micro of hydrogensulfite reagents (2.5M sodium hydrogen sulfite and 125mM hydroquinone, pH 5.0) l, and it incubates at 50 ** for 16 hours.

[0053]

2.2 Processing using MGP

deamination DNA 312microl -- a binding buffer (the MagNaPure DNA isolation kit I.) It incubates for 15 minutes at a room temperature, mixing with Roche catalog number 3003990600microl and 75micro of magnetic glass particle solutions (MagNaPure DNA isolation kit I) l, and stirring continuously. Then, it is a magnetic glass particle 70% It washes 3 times by 1 ml of ethanol. What is not combined with a magnetic separator (Roche catalog number 1641794) is separated. Then, it incubates for 10 minutes at a room temperature, desulfonating by adding EtOH/20mM NaOH 250microl to DNA combined with MGP 90%, and mixing; mixture. It is MGP after that 90% It washes twice by ethanol. In order to remove the remainder of ethanol, MGP was heated at 15 minutes/60 ** in the thermostat mixer which opened the lid. Then, DNA is eluted by 10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5(15-minute/60 **)50microl. Eluted DNA 10microl is used by the next PCR analysis.

[0054]

2.3 Hydrogensulfite processing using Intergen kit

Methylated DNA () [Intergen and] It is an Intergen CpGenome DNA modification kit () about offer; catalog number S7821 30ng and 6ng from Serologicals Corporation, Norcross, GA, and USA. [Intergen and] In accordance with the method indicated to package insertion of the offer; catalog number S7820, it processed from Serologicals Corporation, Norcross, GA, and USA (per concentration ten duplicates). Eluted DNA 10microl is used for the next PCR analysis.

[0055]

2.4 Detection of DNA which carried out hydrogensulfite processing using specific PCR in LightCycler (registered trademark) device (hype robe form)

2.4.1 Presentation of master mix

LightCycler (registered trademark) FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x (Roche2239272), 2mM MgCl₂ and 0.5microM A forward primer and 0.5microM A reverse primer and 250nM A donor probe and 250nM Acceptor probe and mold 10mul, total PCR capacity 20microl.

[0056]

2.4.2 PCR conditions

Denaturation 10 minutes/95 **

55 cycles 95 **/10 seconds

65 **/10 seconds - signal acquisition

72 **/10 seconds Ramp time 20 **/second

It was parallel and the sample from MGP hydrogensulfite processing and Intergen hydrogensulfite processing was made to act in the same operation of a LightCycler (registered trademark) device.

[0057]

2.4.3 Result

[Table 2]

複製	メチル化DNA		使用した亜硫酸水素塩法	
	亜硫酸水素塩	PCR	Intergen	MGP 法
C_{1-} 値または交差点				
1	30 ng	6 ng	29.90	30.46
2			30.07	29.86
3			30.07	30.44
4			30.14	30.35
5			30.22	30.24
6			30.26	30.46
7			30.31	30.50
8			30.19	30.54
9			30.03	30.17
10			29.85	30.69
1	6 ng	1.2 ng	32.49	32.14
2			32.67	32.60
3			32.29	32.83
4			32.87	32.53
5			32.15	32.90
6			32.23	32.77
7			32.59	32.73
8			32.91	33.09
9			32.46	32.88
10			33.17	32.83

[0058]

C_T value or the crossing computed between real-time PCR is almost the same about both used hydrogensulfite methods, namely, its performance of a method is the same.

[0059]

3. Automation hydrogensulfite reaction using example 3:MGP

3.1 Performance of hydrogensulfite reaction

3.1.1 Denaturation of DNA

Methylated DNA (it is offer; catalog number S7821 from Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, and USA) dilution (50ng / assay) 20microl, Poly (dA) solution (concentration 250ng/mul) 4microl and 2M NaOH 2.6microl are mixed, and it incubates for 10 minutes at 37 **.

[0060]

3.1.2 Deamination of DNA

Denatured DNA 26microl is mixed with 220micro of hydrogensulfite reagents (2.5M sodium hydrogen sulfite and 125mM hydroquinone, pH 5.0) 1, and it incubates at 50 ** for 4 hours.

[0061]

3.1.3 Automation processing using MagNaPure LC device

deamination DNA 250microl -- a binding buffer (the MagNaPure DNA isolation kit I.) Roche, Mannheim, Germany600microl, and a magnetic glass particle solution (the MagNaPure DNA isolation kit I.) It incubates for 15 minutes at a room temperature, mixing with Roche, Mannheim, and Germany75microl, and stirring continuously. Then, it is a magnetic glass particle 70% It washes 3 times by 1 ml of ethanol. Then, it incubates for 10 minutes at a room temperature, desulfonating by adding EtOH/20mM NaOH 250microl to DNA combined with MGP 90%, and mixing; mixture. It is MGP after that 90% It washes twice by ethanol and is eluted by 10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5(7-minute/80 **)50microl.

[0062]

3.1.4 Detection of DNA by using specific PCR in LightCycler (registered trademark) device (hype robe form) which carried out hydrogensulfite processing

3.1.4.1 Presentation of master mix

LightCycler (registered trademark) FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x, 2mM MgCl₂ and 0.5microM A forward primer and 0.5microM A reverse primer and 250nM A donor probe and 250nM Acceptor probe and mold 5mul, total PCR capacity 20microl.

[0063]

3.1.4.2 PCR conditions

Denaturation 10 minutes/95 **

55 cycles 95 **/10 seconds

65 **/10 seconds - signal acquisition

72 **/10 seconds 20 **/second ramp time

[0064]

3.1.4.3 Result

[Table 3]

テンプレート	ng DNA	ng DNA	
	亜硫酸水素塩アッセイあたり	PCRあたり	交差点
ユニバーサルメチル化DNA	100	10	33.97
			36.66
ユニバーサルメチル化DNA	50	5	35.66
			35.82
			37.67
			38.37
		1	37.82
			39.89
			38.76
			39.85

[0065]

The result shows the crossing about each used concentration. This means that the automated hydrogensulfite processing was successful.

[0066]

4. Example 4 : performance of hydrogensulfite reaction using glass fleece

4.1 Denaturation of DNA

the methylated DNA (it is offer; catalog number S7821 from Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, and USA) dilution (30ng and 6 --) [ng./and] 100micro of ten duplicates 1 per each concentration are mixed with 2M NaOH 12microl, and it incubates for 15 minutes at 37 **.

[0067]

4.2 Deamination of DNA

Denatured DNA It incubates at 16 hours/50 **, mixing 112microl continuously with 200micro of hydrogensulfite reagents (2.5M sodium hydrogen sulfite and 125mM hydroquinone, pH 5.0) 1.

[0068]

4.3 Processing of DNA in high pure PCR mold preparation kits (Roche catalog number 1796828) by which deamination was carried out

- Mix deamination DNA312microl with binding buffer 200microl from a kit, and isopropanol 100microl, and carry out pipetting to the column accompanied by glass fleece. Subsequently, a column is centrifuged with the Eppendorf table top centrifuge (1 minute/8000rpm).

- They are after that and a column 80% It washes 3 times respectively by ethanol 500microl (centrifugal separation 10 seconds/, 12000rpm).

- Add 250micro of reagents (38% ethanol / 100mM NaCl/200mM NaOH) 1 to a column for desulfonation. After the incubation of 5 minute / room temperature, centrifugal separation 1 minute/, 800rpm.

- They are after that and a column 80% It washes twice respectively by ethanol 500microl (centrifugal separation 10 seconds/, 12000rpm).

- DNA united by finally adding elution (70 ***) buffer (10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5) 50microl warmed beforehand is eluted, and they are centrifugal separation 1 minute/, and 800rpm.

[0069]

4.4 Detection of DNA by using specific PCR in LightCycler (registered trademark) device (hype robe form) which carried out hydrogensulfite processing

4.4.1 Presentation of master mix

LightCycler (registered trademark) FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x (Roche 2239272), 2mM MgCl₂ and 0.5microM A forward primer and 0.5microM A reverse primer and 250nM A donor probe and 250nM Acceptor probe and mold 10mul, total PCR capacity 20microl.

[0070]

4.4.2 PCR conditions

Denaturation 10 minutes/95 **

55 cycles 95 **/10 seconds

65 **/10 seconds - signal acquisition

72 **/10 seconds 20 **/second ramp time

[0071]

4.4.3 Result

[Table 4]

メチル化DNA		C _T -値または 交差点	メチル化DNA		C _T -値または 交差点
亜硫酸水素塩 アッセイ	PCR		亜硫酸水素塩 アッセイ	PCR	
30 ng	6 ng	32.27	6 ng	1.2 ng	34.28
		32.01			35.70
		31.89			35.52
		33.23			36.23
		32.18			35.05
		32.63			35.60
		32.65			34.75
		32.26			34.86
		32.00			34.80
		31.84			34.93

[0072]

The result shows the crossing about each used concentration. This means that the hydrogensulfite processing which uses glass fleece was successful.

[0073]

5. Example 5 : performance of hydrogensulfite reaction in glass fleece solid phase

5.1 Combination to glass fleece of DNA

DNA (hDNA(Roche) 1microg and methylation DNA () [Intergen and] Serologicals Corporation, Norcross, GA, and USA -- offer; 100micro of mixtures 1 of catalog number S7821 100ng -- a binding buffer (a high pure PCR mold preparation kit.) A mixture is carried out to Roche catalog number 1796828200microl and isopropanol 100microl. Pipetting of the mixture is carried out to the column from a kit. Subsequently, a column is centrifuged with the Eppendorf table top centrifuge (1 minute/8000rpm). The washing buffer from a kit washes fleece twice (500microper washing process 1).

[0074]

5.2 Denaturation of DNA combined with glass fleece

Pipetting of EtOH/100mM NaOH/the 200mM NaCl 200microl is carried out to glass fleece 38%, and it is made to denaturalize by incubating for [both] 10 minutes at a room temperature.

[0075]

Fleece is washed once by washing buffer 500mul from a kit after that.

[0076]

5.3 Deamination of DNA combined with glass fleece

Pipetting of 200micro of the deamination solutions (6.25M urea / 2M sodium hydrogen sulfite /pH5.0) 1 is carried out to fleece accompanied by DNA, and it incubates at 50 ** during a water bath continuously for 16 hours.

[0077]

a deamination reagent is removed after that and the washing buffers in 500micro of each 1 from a kit wash fleece twice.

[0078]

5.4 Desulfonation of DNA which was combined with glass fleece and by which deamination was carried out

250micro of reagents (90% ethanol / 20mM NaOH) 1 are added to a column for desulfonation. A column is centrifuged at 1 minute/8000rpm after the incubation of 15 minute / room temperature. Then, it is a column respectively 80% It washes twice by ethanol 500microl (10 seconds/12000rpm centrifugal separation).

[0079]

5.5 Elution of DNA

DNA united by finally adding elution (70 **) buffer (10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5) 50microl warmed beforehand is eluted, and they are centrifugal separation 1 minute/, and 8000rpm.

[0080]

5.6 Detection of DNA by using specific PCR in LightCycler (registered trademark) device (hype robe form) which carried out hydrogensulfite processing

5.6.1 Presentation of master mix

LightCycler (registered trademark) FastStart DNA Master HybridizationProbe 1x (Roche 2239272), 2mM MgCl₂ and 0.5microM A forward primer and 0.5microM A reverse primer and 250nM A donor probe and 250nM Acceptor probe and mold 10mul, total PCR capacity 20microl.

[0081]

5.6.2 PCR conditions

Denaturation 10 minutes/95 **

55 cycles 95 **/10 seconds
65 **/10 seconds - signal acquisition
72 **/10 seconds 20 **/second ramp time

[0082]

5.6.3 Result

[Table 5]

サンプル番号	PCRあたりのメチル化DNA	交差点
1	20ng	34.90
2	20ng	35.27
3	20ng	36.09
4	20ng	36.80

[0083]

In each reaction, the growth curve was detected and the crossing was computed. It is shown that the deamination on glass fleece and desulfonation are possible for this result.

[0084]

List of references

- Abramson, R. D. and Myers, T. W., and Curr Opin Biotechnol 4 (1993) 41-7
Alderton, R. P. et al., and Anal Biochem 201 (1992) 166-9
Ausubel, F. et al., and "Current protocols in molecular biology" (1994) The volume F. Ausubel, R.Brent, and on K. R.E., Wiley & Sons Verlag, New York
Barany, F., PCR Methods Appl 1 (1991) 5-16
Barany, F., Proc Natl Acad Sci U S A 88 (1991) 189-93
Benyajati, C. et al., and Nucleic Acids Res 8 (1980) 5649-67
Braunauer, "The Adsorption of Gases and Vapors" (1943) Princeton University Press
Clark, S. J. et al., and Nucleic Acids Res 22 (1994) 2990-7
The Germany patent No. 3724442 specification
Germany patent laying-open of application 37th 34 The No. 442 specification
European patent 0th 200 The No. 362 specification
European patent 0th 201 The No. 184 specification
European patent 0th 389 The No. 063 specification
European patent 0th 439 The No. 182 specification
Feil, R. et al., and Nucleic Acids Res 22 (1994) 695-6
Frommer, M. et al., and Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 1827-31
British patent of/[91st] No. 00212 specification
Grigg, G. and Clark, S., and Bioessays 16 (1994) 431-6
Grigg, G. W., DNA Seq 6 (1996) 189-98
Grunau, C. et al., Nucleic Acids Res 29 (2001) E65-5
Guatelli, J. C. et al., and Proc Natl Acad Sci USA 87 (1990) 1874-8
Jakobi, R. et al., and Anal Biochem 175 (1988) 196-201
Komiyama, M. and Oshima, S., and Tetrahedron Letters 35 (1994) 8185-8188
Kwoh, D. Y. et al., and Proc Natl Acad Sci U S A 86 (1989) 1173-7
Lottspeich and Zorbas, "Bioanalytik" (1998) The volume on L. a. Zorbas, Spektrum

Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany
Marko, M. A. et al., and Anal Biochem 121 (1982) 382-7
Morrow, C.S. et al., Gene 75 (1989), 3-11
Oakeley, E. J., Pharmacol Ther 84 (1999) 389-400
Olek, A. et al., and Nucleic Acids Res 24 (1996) 5064-6
Paulin, R. et al., and Nucleic Acids Res 26 (1998) 5009-10
Raizis, A. M. et al., and Anal Biochem 226 (1995) 161-6
Sambrook, J. et al., and "Molecular Cloning : A Laboratory Manual." (1989) Eds. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
Spray Drying Handbook (1991), John Wiley & Sons, New York
U.S. Pat. No. 4,683,202 specification
U.S. Pat. No. 5,130,238 specification
U.S. Pat. No. 5,137,806 specification
U.S. Pat. No. 5,210,015 specification
U.S. Pat. No. 5,234,809 specification
U.S. Pat. No. 5,487,972 specification
U.S. Pat. No. 5,552,277 specification
U.S. Pat. No. 5,595,890 specification
U.S. Pat. No. 5,639,611 specification
U.S. Pat. No. 5,786,146 specification
U.S. Pat. No. 5,804,375 specification
U.S. Pat. No. 6,174,670 specification
U.S. Pat. No. 6,331,393 specification
Vogelstein, B. and Gillespie, D., and Proc Natl Acad Sci U S A 76 (1979) 615-9
Warnecke, P. M. et al., and Methods 27 (2002) 101-7
Whelen, A. C. and Persing, D. H., and Annu Rev Microbiol 50 (1996) 349-73
The international publication 00th/No. 32762 pamphlet
The international publication 00th/No. 37291 pamphlet
The international publication 01st/No. 37291 pamphlet
The international publication 01st/No. 98528 pamphlet
The international publication 02nd/No. 31186 pamphlet
The international publication 90th/No. 01069 pamphlet
The international publication 90th/No. 06045 pamphlet
The international publication 92nd/No. 02638 pamphlet
92nd/international publication 0880A item pamphlet
The international publication 96th/No. 41811 pamphlet
The international publication 99th/No. 16781 pamphlet
The international publication 99th/No. 40098 pamphlet
Wu, D. Y. and Wallace, R. B., and Genomics 4 (1989) 560-9
[Industrial applicability]
[0085]
This invention can be used in order to determine the position of the methylation in nucleic acid, i.e., methylation, and non-methylating cytosine.

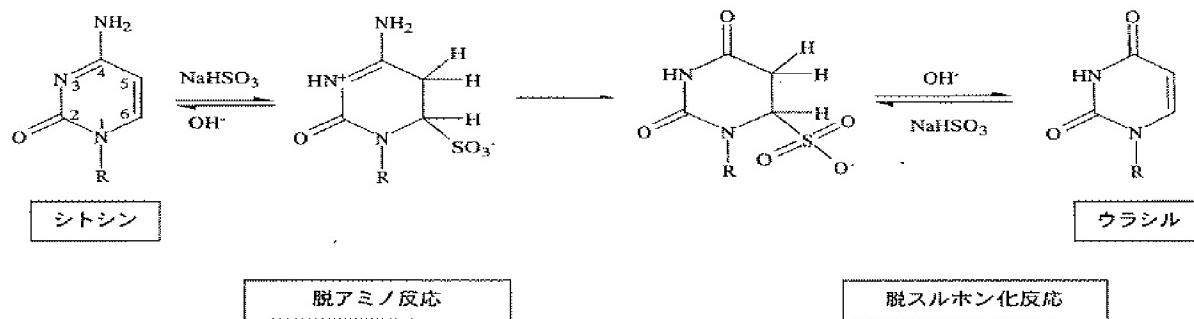
DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[0086]

[Drawing 1] Drawing 1 is a figure showing the reaction of a hydrogensulfite and cytosine in nucleic acid.

亜硫酸水素塩と核酸中のシトシンとの反応



SEQUENCE LISTING

[Layout Table]

200408919500001.app

SEQUENCE LISTING

<110> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

<120> Improved method for bisulfite treatment

<130> ROC-03-015

<150> EP 02 019 097.1

<151> 2002-08-29

<150> EP 02 028 114.3

<151> 2002-12-18

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4261

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<220>
<221> misc_signal
<222> (1156)..(1162)
<223> transcription regulatory motif; putative

<220>
<221> GC_signal
<222> (1169)..(1174)
<223>

<220>
<221> GC_signal
<222> (1179)..(1184)
<223>

<220>
<221> TATA_signal
<222> (1194)..(1198)
<223>

<220>
<221> exon
<222> (1225)..(1254)
<223>

<220>
<221> polyA_signal
<222> (4041)..(4046)
<223>

<300>
<308> Genbank/M24485
<309> 2000-03-04

<400> 1
aacaagagat caatatctag aataaatgga gatctgcaaa tcaacagaaa gtaggcagca      60
aagccaaaga aaatagccta aggcacagcc actaaaagga acgtgatcat gtccttgca      120
gggacatggg tggagctgga agccgttagc ctcagcaaac tcacacagga acagaaaacc      180
agcgagaccg catggtctca cttataagtg ggagctgaac aatgagaaca catggtcaca      240
tggcggcgat caacacacac tggtgctgt tgagcggggt gctggggagg gagagtacca      300
ggaagaatag ctaaggata ctgggcttaa tacctgggtg atggatgat ctgtacagca      360
aaccatcatg gcgcacacac ctatgttaaca aacctgcaca tcctgcacat gtaccccaga      420
acttcaaata aaagttggac ggccaggcgt ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt      480
gggaagccga ggcgtgcaga tcacctaagg tcaggagttc gagaccagcc cgcccaacat      540
ggtgaaaccc cgtctctact aaaaatacaa aaatcagcca gatgtggcac gcacctataa      600

```

ttccacacctac tcgggaggct gaagcagaat tgcttgaacc cgagaggcgg aggttgcagt 660
gagccgccga gatcgcccca ctgcactcca gcctggcca cagcgtgaga ctacgtcata 720
aaataaaata aaataaacaca aaataaaaata aaataaaaata aaataaaata aaataataaa 780
ataaaaataaa ataaaataaa ataaaataaa ataaagcaat ttccttcct ctaagcggcc 840
tccaccccctc tccccgtccc tgtgaagcgg gtgtgcaagc tccggatcg cagcggtctt 900
agggaaatttc cccccgcgat gtcccgccgc gccagttcgc tgcgcacact tcgctgcgg 960
cctcttcctg ctgtctgttt actccctagg ccccgctggg gacctggaa agagggaaag 1020
gcttccccgg ccagctgcgc ggcgactccg gggactccag ggcgccccctc tgccggccgac 1080
gcccggggtg cagcggccgc cggggctggg gccggcggga gtccgcggga ccctccagaa 1140
gagcggccgg cgccgtgact cagcactggg gcggagcggg gcgggaccac cttataagg 1200
ctcggaggcc gcgaggcctt cgct gga gtt tcg ccg cag tct tcg cca 1251
cca gtgagtaacgc gcggcccgct ccccgggat ggggctcaga gctccagca 1304
tggggccaac ccgcagcatc aggcccggc tcccgccagg gtcctcgcc cacctcgaga 1364
cccgccggacgg gggcctaggg gacccaggac gtccccagtg ccgttagcgg cttcagggg 1424
gcccggagcg ctcggggag ggatgggacc ccggggcgg ggaggggggg caggctgcgc 1484
tcaccgcgccc ttggcattct ccccgggct ccagcaaact tttcttgcgt cgctgcagtg 1544
ccgcccata cctgttgtcta tttcccagtt cgaggttagga gcatgtgtct ggcaggaaag 1604
ggaggcaggg gctggggctg cagccacag cccctcgccc acccggagag atccgaaccc 1664
ccttatccct ccgtcgtgtg gctttaccc cgggcctcct tcctgttccc cgcctctccc 1724
gccatgcctg ctccccggc cagtgttgtg tgaaatcttc ggaggaacct gtttacctgt 1784
tccctccctg cactcctgac ccctccccgg gttgctgcga ggcggagtcg gcccggtccc 1844
cacatctcgt acttctccct ccccgccaggc cgctgcgcgg ccctgcgcac gctgctggca 1904
gatcaggggcc agagctggaa ggaggaggtg gtgaccgtgg agacgtggca ggagggctca 1964
ctcaaagccct cctgcgttaag tgaccatgcc cggcaaggg gaggggggtgc tggccttag 2024
ggggctgtga ctaggatcgg gggacgccc agctcagtgc ccctccctga gccatgcctc 2084
ccccaaacagc tatacggca gctccccaaag ttccaggacg gagacctcac cctgtaccag 2144
tccaataacca tcctgcgtca cctggccgc acccttggtg agtcttgaac ctccaagtcc 2204
agggcaggca tggcaagcc tctgcccccg gagcccttt gttaaatca gctgccccgc 2264
agccctctgg agtggaggaa actgagaccc actgaggtta cgtagttgc ccaaggtcaa 2324

gcctgggtgc ctgcaatcct tgccctgtgc caggctgcct cccaggtgtc aggtgagtc 2384
tgagcacctg ctgtgtggca gtctctcatc cttccacgca catcctcttc ccctcctccc 2444
aggctggggc tcacagacag ccccctggtt ggcccatccc cagtgactgt gtgttcatca 2504
ggcgccccagt cacgcggcct gctccctcc acccaacccc agggcttat gggaaaggacc 2564
agcaggaggc agccctggtg gacatggta atgacggcgt ggaggaccc cgctgcaaat 2624
acatctccct catctacacc aactatgtga gcatctgcac cagggttggg cactggggc 2684
tgaacaaaga aaggggcttc ttgtgccctc accccccta cccctcaggt ggcttggct 2744
gacccttct tgggtcaggg tgcagggct gggtcagctc tggccaggg gcccagggc 2804
ctgggacaag acacaacctg cacccttatt gcctggaca tcaaccagcc aagtaacggg 2864
tcatggggc gagtgcaagg acagagacct ccagcaactg gtggttctg atccctggg 2924
gtggcgaggg cttcctggag tagccagagg tggaggagga tttgtcgcca gtttctggat 2984
ggaggtgctg gcacttttag ctgagggaaa tatgcagaca cagagcacat ttggggacct 3044
gggaccagtt cagcagaggc agcgtgtgt cgctgcgtg tgcgtgtgt tgcgtgtgt 3104
tgtgtacgct tgcattgtc tcgggtgggt aaggagatag agatggcg 3164
caggtcccga aggccctgaa cccactggtt tggagtctcc taaggcaat gggggccatt 3224
gagaagtctg aacagggctg tgtctgaatg tgaggtctag aaggatcctc cagagaagcc 3284
agctctaaag ctttgcaat catctggta gagaacccag caaggatgga caggcagaat 3344
ggaatagaga ttagttggca gctgaagtgg acaggatttgcgtactagcct ggttgtgggg 3404
agcaagcaga ggagaatctg ggactctggt gtctggcctg gggcagacgg ggggtctca 3464
ggggctggga gggatgagag taggatgata catgggtgtc tctggcagga ggccggcaag 3524
gatgactatg tgaaggcact gcccgggcaa ctgaagcctt ttgagaccct gctgtcccag 3584
aaccagggag gcaagacctt cattgtggta gaccaggtga gcatctggcc ccatgctgtt 3644
ccttcctcgc caccctctgc ttccagatgg acacaggtgt gagccatttgcgtacta 3704
cagagcagac ctagggatg ggcttaggcc ctctgcccc aattcctcca gcctgctccc 3764
gctggctgag tccctagccc ccctgcccgt cagatctcttgcgtacta caacctgctg 3824
gacttgctgc ttagccatga ggtcctagcc cctggctgccc tggatgcgtt cccctgctc 3884
tcagcatatg tggggcgct cagtggccgg cccaagctca aggcccttcttgcgtacta 3944
gagtacgtga acctccccat caatggcaac gggaaacagt gagggttggg gggactctga 4004

gcgggaggca gagttgcct tccttctcc aggaccaata aaatttctaa gagagctact	4064
atgagcactg tgttcctgg gacggggctt aggggttctc agcctcgagg tcggtgggag	4124
ggcagagcag aggactagaa aacagctcct ccagcacagt cagtggcttc ctggagccct	4184
cagcctggct gtgttactg aacctcacaactagaagag gaagaaaaaa aaagagagag	4244
agaaacaaag agaaata	4261

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-89195

(P2004-89195A)

(43) 公開日 平成16年3月25日(2004.3.25)

(51) Int.C1.⁷
C12N 15/09F 1
C12N 15/00 ZNAAテーマコード(参考)
4B024

審査請求 有 請求項の数 21 O L (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2003-306141 (P2003-306141)
 (22) 出願日 平成15年8月29日 (2003.8.29)
 (31) 優先権主張番号 02019097.1
 (32) 優先日 平成14年8月29日 (2002.8.29)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 02028114.3
 (32) 優先日 平成14年12月18日 (2002.12.18)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591003013
 エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCHE
 AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124
 (74) 代理人 100095832
 弁理士 細田 芳徳
 (72) 発明者 クリストィーネ マルカートーハーン
 ドイツ連邦共和国 ベンツベルク 823
 77 ゼールヴァイヘルシュトラーセ 5
 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 亜硫酸水素塩処理のための改善された方法

(57) 【要約】

【課題】 手動により容易に実施できる亜硫酸水素塩反応、慣用的な分析装置により取扱うことができる固相、とりわけ磁性ガラス粒子を使用する亜硫酸水素塩反応、ならびに、核酸が亜硫酸水素塩反応の成功に影響し得る種々の相互作用により固相の表面に結合されるので、満足のいく様式で首尾よく実施可能な亜硫酸水素塩反応を提供すること。

【解決手段】 核酸が脱アミノ工程および/または脱スルホン化工程中に固相に結合されていることを特徴とする、核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法、核酸中のシトシン塩基が亜硫酸水素イオンの存在下でウラシル塩基に変換される反応の脱アミノ工程および/または脱スルホン化工程における固相の使用、ならびに亜硫酸水素イオンを含む溶液および固相を含んでなる亜硫酸水素塩反応を実施するためのキット。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核酸が脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程中に固相に結合されていることを特徴とする、核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法。

【請求項 2】

- a) 核酸を固相に結合する工程、
 - b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、
 - c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、
 - d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核 10 酸が脱スルホン化される工程、
 - e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、および
 - f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程
- を含む、請求項 1 記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法。

【請求項 3】

- a) 亜硫酸水素イオンの存在下で核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、
 - b) 脱アミノ核酸を固相に結合する工程、
 - c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、
 - d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核 20 酸が脱スルホン化される工程、
 - e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、および
 - f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程
- を含む、請求項 1 記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法。

【請求項 4】

- a) 核酸を固相に結合する工程、
 - b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、
 - c) 固相結合核酸を任意に洗浄する工程、
 - d) 固相から脱アミノ核酸を溶出する工程、および
 - e) アルカリ条件下で脱アミノ核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程
- を含む、請求項 1 記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法。

30

【請求項 5】

固相がシリカまたはガラスを含む材料であることを特徴とする請求項 1～4 いずれか記載の方法。

【請求項 6】

固相がガラスフリースまたはガラス膜であることを特徴とする請求項 1～5 いずれか記載の方法。

40

【請求項 7】

固相が磁性ガラス粒子であることを特徴とする請求項 1～5 いずれか記載の方法。

【請求項 8】

磁性ガラス粒子が 0.5 μm～5 μm の平均直径を有することを特徴とする請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

磁性ガラス粒子が 5～500 nm の直径を有する磁性物体を含むことを特徴とする請求項 7 または 8 記載の方法。

【請求項 10】

磁性ガラス粒子が 23 nm の平均直径を有する磁性物体を含むことを特徴とする請求項 9 記載の方法。

50

【請求項 1 1】

磁性ガラス粒子がゾルーゲル法により製造されることを特徴とする請求項 7 ~ 10 いずれか記載の方法。

【請求項 1 2】

前記ゾルーゲル法が

- a) ゾル中で磁性物体を懸濁する工程、
 - b) 該ゾルを加水分解して磁性物体をゲルで覆う工程、
 - c) ツーノズル噴霧乾燥機中でゲルで覆われた磁性物体を噴霧乾燥する工程、および
 - d) 噴霧乾燥粉末を焼結して磁性物体を覆うゲルからガラスを形成する工程
- を含む、請求項 1 1 記載の方法。

10

【請求項 1 3】

核酸中のシトシン塩基が亜硫酸水素イオンの存在下でウラシル塩基に変換される反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程における固相の使用。

【請求項 1 4】

固相がシリカまたはガラスを含む材料である請求項 1 3 記載の使用。

【請求項 1 5】

固相がガラスフリースまたはガラス膜である請求項 1 3 または 1 4 記載の使用。

【請求項 1 6】

固相が磁性ガラス粒子である請求項 1 3 または 1 4 記載の使用。

【請求項 1 7】

20

亜硫酸水素イオンを含む溶液および固相を含んでなる亜硫酸水素塩反応を実施するためのキット。

【請求項 1 8】

固相がシリカまたはガラスを含む物質である請求項 1 7 記載のキット。

【請求項 1 9】

固相がガラスフリースまたはガラス膜である請求項 1 7 または 1 8 記載のキット。

【請求項 2 0】

固相が磁性ガラス粒子である請求項 1 7 または 1 8 記載のキット。

【請求項 2 1】

30

核酸中のシトシン塩基が亜硫酸水素イオンの存在下でウラシル塩基に変換される反応のための請求項 1 7 ~ 2 0 いずれか記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、核酸におけるメチル化の位置、すなわちメチル化および非メチル化シトシンを決定するために、亜硫酸水素塩反応を実施し、それにより、核酸が亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間に固相に結合される方法に関する。固相は、好ましくは、ガラスまたはシリカ、より好ましくは、ガラスフリース、ガラス膜または磁性ガラス粒子を含む材料である。さらに、亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間に核酸を結合するための固相の使用並びに亜硫酸水素塩試薬および固相を含有するキットが開示される。

【背景技術】

【0 0 0 2】

遺伝子は、全哺乳動物ゲノムのわずかな部分のみを構成し、そして非コード化デオキシリボ核酸 (DNA) のバックグラウンドの圧倒的な存在のもとでのその発現の正確な制御は、その調節に関する実質的な問題を提示する。イントロン、反復エレメントおよび潜在的活性化転位因子を含む非コード化DNAは、その長期間サイレンシングに有効なメカニズムを必要とする。哺乳動物は、シトシンメチル化により提供される可能性を利用して、DNA-タンパク質相互作用を変化させる遺伝性メカニズムを提供し、かかるサイレンシングを援助しているようである。DNAメチル化は、哺乳動物の発達に必須であり；そして加齢およ

50

び癌に潜在的役割を果たす。遺伝子発現の調節における、および刷り込まれた遺伝子をマークする後成的修飾としてのメチル化の関与は、十分に確立されている。哺乳動物では、メチル化は、シトシン残基においてのみ、そしてより具体的には、グアノシン残基に隣接するシトシン残基においてのみ、すなわちCG配列で生じる。DNAメチル化部位の検出およびマッピングは、所定の配列がメチル化されているかどうかを示す分子シグナルの理解のために必須の工程である。

【 0 0 0 3 】

これは、現在、5-メチルシトシンの検出に関して、いわゆる亜硫酸水素塩法により達成されている（例えば、非特許文献1参照）。5-メチルシトシンをマッピングする亜硫酸水素塩法は、亜硫酸水素ナトリウムがシトシンと反応するが、5-メチルシトシンとは全くまたはわずかしか反応しないという影響を用いている。シトシンは、亜硫酸水素塩と反応して、アルカリ性条件下でウラシルに脱スルホン化され得るスルホン化ウラシルを生じる脱アミノしやすいスルホン化シトシン反応中間体を形成する。ウラシルが、遊離体シトシンとは異なるチミンの塩基対合挙動を有し、一方5-メチルシトシンが、シトシンの塩基対合挙動を有することは一般的な知識である。これにより、例えば亜硫酸水素塩ゲノムシーケンシングまたはメチル化特異的PCR（MSP）によるメチル化または非メチル化シトシンの区別が可能となる（例えば、非特許文献2、非特許文献3または特許文献1参照）。

【 0 0 0 4 】

亜硫酸水素塩反応の特定の局面を扱う種々の文献があり（例えば、非特許文献4参照）、5-メチルデオキシシトシンおよびデオキシシトシンの亜硫酸水素塩修飾に対して一般的な研究を行い（例えば、非特許文献5参照）、亜硫酸水素塩塩基シーケンシングの方法を開示し、それにより亜硫酸水素塩処理および続くPCR工程がアガロースビーズに包埋した材料上で実施される。亜硫酸水素塩法では、脱アミノの後、サンプルが脱塩される（例えば、非特許文献6参照）。

【 0 0 0 5 】

鋳型分解を最小にする5-メチルシトシンマッピングの亜硫酸水素塩法を開示している（例えば、非特許文献7参照）。彼らは、pH、温度および反応時間の影響を研究している。同様の研究がなされている（例えば、非特許文献8または非特許文献9参照）。亜硫酸水素塩混合物における種々のさらなる成分が、開示されている（例えば、特許文献2または非特許文献10参照）。亜硫酸水素塩処理およびPCRの後のさらなる亜硫酸水素塩工程が開示されている（例えば、特許文献3参照）。オリゴデオキシリボヌクレオチドにおけるシトシンの亜硫酸水素塩誘導脱アミノの触媒について研究されている（例えば、非特許文献11参照）。

【 0 0 0 6 】

亜硫酸水素塩処理を実施するためのキットは、Serologicals Corporation、Norcross G A、USAにより提供されるIntergenから市販され、例えばCpGenomeTM DNA修飾キットである。

【 0 0 0 7 】

脱アミノの後、ゲノムDNAが、ガラスビーズに結合され、洗浄される、亜硫酸水素塩ゲノムシーケンシングの変法が、開示されている（例えば、非特許文献12参照）。溶出後、核酸は脱スルホン化される。核酸のガラス表面への結合挙動、例えばシリカゲルまたは2価土類に対する吸着、磁性ガラス粒子（MGP）またはカオトロピック条件下での有機シラン粒子への吸着を用いることにより核酸が単離され得ることは公知である。固相を用いる抽出は、通常、目的の物質の固相への結合を可能にする条件下で、核酸を含有する溶液を固相に添加し、固相結合核酸の残りの溶液の除去、および続いて固相から液状溶出液への核酸の放出（しばしば溶出と称する）の工程を含む。かかる方法の結果は、通常溶解した状態で目的の物質を含有する溶液である。

【特許文献1】米国特許第5786146号明細書

【特許文献2】国際公開第01/98528号パンフレット

【特許文献3】国際公開第02/31186号パンフレット

【非特許文献 1】 フロマー・エム (Frommer, M.) ら、「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」、1992年、第89巻、p.1827-1831

【非特許文献 2】 グリッジ・ジー (Grigg, G.) およびクラーク・エス (Clark, S.)、「Bioessays」、1994年、第16巻、p.431-436

【非特許文献 3】 グリッジ・ジー・ダブリュー (Grigg, G.W.)、「DNA Seq」、1996年、第6巻、p.189-198

【非特許文献 4】 ベンヤジャティ・シー (Benyajati, C.) ら、「Nucleic Acids Res.」、1980年、第8巻、p.5649-5667

【非特許文献 5】 オレク・エー (Olek, A.) ら、「Nucleic Acids Res.」、1996年、第24巻、p.5064-5066

【非特許文献 6】 クラーク・エス・ジェー (Clark, S.J.) ら、「Nucleic Acids Res.」、1994年、第22巻、p.2990-2997

【非特許文献 7】 ライジス・エー・エム (Raizis, A.M.) ら、「Anal. Biochem.」1995年、第226巻、p.161-166

【非特許文献 8】 グラノウ・シー (Grunau, C.) ら、「Nucleic Acids Res.」、2001年、第29巻、p.E65-5

【非特許文献 9】 ワルネケ・ピー・エム (Warnecke, P.M.) ら、「Methods」、2002年、第27巻、p.101-107

【非特許文献 10】 ポウリン・アール (Paulin, R.) ら、「Nucleic Acids Res.」、1998年、第26巻、p.5009-5010

【非特許文献 11】 コミヤマ・エム (Komiya, M.) およびオオシマ・エス (Oshima, S.)、「Tetrahedron Letters」、1994年、第35巻、p.8185-8188

【非特許文献 12】 フェイル・アール (Feil, R.) ら、「Nucleic Acids Res.」、1994年、第22巻、p.695-696

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 8】

亜硫酸水素塩処理に関する全ての先行技術の方法には欠点がある。従って、本発明により解決されるべき問題は、先行技術の方法の欠点を打破する方法を提供することであった。

【0 0 0 9】

本発明の目的は、慣用的な分析装置を利用できない小規模な研究室では、手動により容易に実施できる亜硫酸水素塩反応を提供し、大量のサンプル処理能力を有している大規模な研究室では、慣用的な分析装置により取扱うことができる固相、とりわけ磁性ガラス粒子を使用する亜硫酸水素塩反応を提供し、核酸が亜硫酸水素塩反応の成功に影響し得る種々の相互作用により固相の表面に結合されるので、満足のいく様式で首尾よく実施可能な亜硫酸水素塩反応を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0 0 1 0】

すなわち、本発明は、

(1) 核酸が脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程中に固相に結合されていることを特徴とする、核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法、

(2) a) 核酸を固相に結合する工程、

b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、

c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、

d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程、

e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、および

f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程

10

20

30

40

50

を含む、前記(1)記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法、

(3) a) 亜硫酸水素イオンの存在下で核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、

b) 脱アミノ核酸を固相に結合する工程、

c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、

d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程、

e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、および

f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程

を含む、前記(1)記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法、

10

(4) a) 核酸を固相に結合する工程、

b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、

c) 固相結合核酸を任意に洗浄する工程、

d) 固相から脱アミノ核酸を溶出する工程、および

e) アルカリ条件下で脱アミノ核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程

を含む、前記(1)記載の核酸中のシトシン塩基のウラシル塩基への変換方法、

(5) 固相がシリカまたはガラスを含む材料であることを特徴とする前記(1)～(4)いずれか記載の方法、

20

(6) 固相がガラスフリースまたはガラス膜であることを特徴とする前記(1)～(5)いずれか記載の方法、

(7) 固相が磁性ガラス粒子であることを特徴とする前記(1)～(5)いずれか記載の方法、

(8) 磁性ガラス粒子が $0.5\text{ }\mu\text{m} \sim 5\text{ }\mu\text{m}$ の平均直径を有することを特徴とする前記(7)記載の方法、

(9) 磁性ガラス粒子が $5 \sim 500\text{ nm}$ の直径を有する磁性物体を含むことを特徴とする前記(7)または(8)記載の方法、

(10) 磁性ガラス粒子が 23 nm の平均直径を有する磁性物体を含むことを特徴とする前記(9)記載の方法、

30

(11) 磁性ガラス粒子がゾルーゲル法により製造されることを特徴とする前記(7)～(10)いずれか記載の方法、

(12) 前記ゾルーゲル法が

a) ゾル中で磁性物体を懸濁する工程、

b) 該ゾルを加水分解して磁性物体をゲルで覆う工程、

c) ツーノズル噴霧乾燥機中でゲルで覆われた磁性物体を噴霧乾燥する工程、および

d) 噴霧乾燥粉末を焼結して磁性物体を覆うゲルからガラスを形成する工程

を含む、前記(11)記載の方法、

(13) 核酸中のシトシン塩基が亜硫酸水素イオンの存在下でウラシル塩基に変換される反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程における固相の使用、

40

(14) 固相がシリカまたはガラスを含む材料である前記(13)記載の使用、

(15) 固相がガラスフリースまたはガラス膜である前記(13)または(14)記載の使用、

(16) 固相が磁性ガラス粒子である前記(13)または(14)記載の使用、

(17) 亜硫酸水素イオンを含む溶液および固相を含んでなる亜硫酸水素塩反応を実施するためのキット、

(18) 固相がシリカまたはガラスを含む物質である前記(17)記載のキット、

(19) 固相がガラスフリースまたはガラス膜である前記(17)または(18)記載のキット、

(20) 固相が磁性ガラス粒子である前記(17)または(18)記載のキット、ならび

50

に

(21) 核酸中のシトシン塩基が亜硫酸水素イオンの存在下でウラシル塩基に変換される反応のための前記 (17) ~ (20) いずれか記載のキットの使用に関する。

【発明の効果】

【 0 0 1 1 】

本発明による方法は、手動により容易に実施でき、従って慣用的な分析装置を利用できない小規模な研究室に適している。大量のサンプル処理能力を有している大規模な研究室では、慣用的な分析装置により取扱うことができる固相、とりわけ磁性ガラス粒子の使用が有利である。さらに、本発明において、核酸は、亜硫酸水素塩反応の成功に影響し得る種々の相互作用により固相の表面に結合されるので、満足のいく様式で首尾よく亜硫酸水素塩反応を実施できる。
10

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 1 2 】

前記で論じた問題は、核酸中のシトシン塩基、好ましくは、複数のシトシン塩基がウラシル塩基、好ましくは、複数のウラシル塩基へ変換され、5-メチルシトシン塩基は有意には変換されず（「亜硫酸水素塩反応」または「亜硫酸水素塩処理」）、それにより亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間に核酸が固相に結合される方法を提供することにより解決される。好ましくは、固相は、ガラスフリース、ガラス膜または磁性ガラス粒子である。さらに本発明は、亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程における固相の使用並びに亜硫酸水素塩反応を実施するための固相および試薬を含有するキットを開示する。
20

【 0 0 1 3 】

亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間の、好ましくは、脱スルホン化工程での固相の使用は、取扱いが簡単で、および／または容易に自動化できるという利点を有している。例えば、ガラスフリースを脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程に用いる場合、時間のかかるDNA沈降反応が必要でなく；非結合分離を遠心分離により容易に達成でき、ガラスフリースの死空間は、無視でき、従って洗浄工程が非常に有効である。潜在的インヒビターが感受性を有意に低減し得るPCRに亜硫酸水素塩処理DNAを用いる場合にこれは有利である。本発明による方法を手動により容易に実施でき、従って慣用的な分析装置を利用できない小規模な研究室に適している。大量のサンプル処理能力を有している大規模な研究室では、慣用的な分析装置により取扱うことができる固相、とりわけ磁性ガラス粒子の使用が有利である。慣用的な亜硫酸水素塩反応では、亜硫酸水素塩が塩基対合に関与しないピリミジンとのみ反応できるような変性条件を選択する。従って、核酸は、亜硫酸水素塩反応の成功に影響し得る種々の相互作用により固相の表面に結合されるので、本発明による方法により満足のいく様式で首尾よく亜硫酸水素塩反応を実施できることは驚くべきことである。
30

【 0 0 1 4 】

本発明によれば、「亜硫酸水素塩反応」、「亜硫酸水素塩処理」または「亜硫酸水素塩法」なる用語は、好ましくは亜硫酸水素イオンの存在下、核酸中のシトシン塩基、とりわけ複数のシトシン塩基がウラシル塩基または複数の塩基へ変換され、好ましくは5-メチルシトシン塩基が有意には変換されない反応を意味する。メチル化シトシンの検出のためのこの反応は、Frommerら（前出）およびGriggおよびClark（前出）により詳細に記載されている。亜硫酸水素塩反応は、別個にまたは同時に行われ得る脱アミノ工程および脱スルホン化工程を含む（図1； GriggおよびClark（前出）を参照）。5-メチルシトシン塩基は、有意に変換されないという記述は、わずかな5-メチルシトシン塩基がウラシルに変換されることを排除できないが、（非メチル化）シトシン塩基のみおよび（非メチル化）シトシン塩基を排他的に変換することを意図するというその事実だけを考慮している（Frommerら、前出）。
40

【 0 0 1 5 】

本発明の方法は、亜硫酸水素塩反応および固定化工程のいくつかの取り合わせにおいて実施することができる。最初の態様では、核酸が固相に結合される間に脱アミノ工程および脱スルホン化工程を行う。従って、本発明の好ましい態様では、

- a) 核酸を固相に結合する工程、
- b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、
- c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、
- d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程、
- e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、ならびに
- f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程

を含む、核酸中のシトシン塩基、好ましくは、複数のシトシン塩基のウラシル塩基、好ましくは、複数のウラシル塩基への変換（「亜硫酸水素塩反応」）、それにより、好ましくは、5-メチルシトシン塩基は有意に変換されない方法が開示されている。

【 0 0 1 6 】

本発明の第2の態様では、脱スルホン化工程は、核酸が固相に結合されている間に行われる。従って、本発明の別の好ましい態様では、

- a) 亜硫酸水素イオンの存在下で核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、
 - b) 脱アミノ核酸を固相に結合する工程、
 - c) 脱アミノ固相結合核酸を任意に洗浄する工程、
 - d) アルカリ条件下で脱アミノ固相結合核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程、
 - e) 脱アミノ脱スルホン化固相結合核酸を任意に洗浄する工程、ならびに
 - f) 固相から脱アミノ脱スルホン化核酸を任意に溶出する工程
- を含む、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基のウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基への変換（「亜硫酸水素塩反応」）、それにより、5-メチルシトシン塩基は有意に変換されない方法が開示されている。

【 0 0 1 7 】

本発明の第3の態様では、脱アミノ工程は核酸が固相に結合されている間に行われる。従って、本発明の別の好ましい態様では、

- a) 核酸を固相に結合する工程、
 - b) 亜硫酸水素イオンの存在下で固相結合核酸をインキュベートし、それにより核酸が脱アミノされる工程、
 - c) 固相結合核酸を任意に洗浄する工程、
 - d) 固相から脱アミノ核酸を溶出する工程
 - e) アルカリ条件下で脱アミノ核酸をインキュベートし、それにより脱アミノ核酸が脱スルホン化される工程
- を含む、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基のウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基への変換（「亜硫酸水素塩反応」）、それにより、5-メチルシトシン塩基は有意に変換されない方法が開示されている。

【 0 0 1 8 】

当業者は、例えば亜硫酸水素塩反応の主要なパラメーターを開示するFrommerら（前出）またはGriggおよびClark（前出）を参照することにより、亜硫酸水素塩反応を実施する方法を知っている。Grunauら（前出）から、亜硫酸水素塩法の変法が可能であることは当業者には公知である。脱アミノ効率およびDNA分解に影響するパラメーターへのインキュベート時間および温度の影響は開示されている。要約すると、脱アミノ工程では、亜硫酸水素イオンを含有する緩衝液、場合によっては、カオトロピック剤および場合によってはアルコールのようなさらなる試薬またはハイドロキノリンのような安定剤を用い、そしてpHは酸性の範囲内である。亜硫酸水素塩の濃度は、0.1から6M亜硫酸水素塩であり、好ま

10

20

40

50

しくは、1Mから5.5Mであり、カオトロピック剤の濃度は、1から8Mであり、それにより、好ましくは、グアニジニウム塩を用い、pHは、酸性の範囲内、好ましくは、4.5から6.5であり、温度は、0°Cから90°C、好ましくは、室温(25°C)から90°Cであり、そして反応時間は、30分から24時間または48時間またはそれ以上、好ましくは、1時間から24時間である。脱スルホン化工程は、例えば、水酸化物(例えば、水酸化ナトリウム)のみを含有する溶液、またはエタノール、塩化ナトリウムおよび水酸化ナトリウムを含有する溶液(例えば38% EtOH、100mM NaCl、200mM NaOH)として、アルカリ性溶液または緩衝液を添加し、室温でまたは高温で数分、好ましくは5分から60分インキュベートすることにより実施される。

【0019】

10

本発明の態様では、核酸は、デオキシリボ核酸(DNA)であり、とりわけゲノムDNAまたは核酸、すなわち生物のゲノムで見出され、そして生存に必要な情報として子孫に継代されるDNAまたは核酸である。別の型のDNA、例えばプラスミド内で見出されるものと区別するためにこの用語を用いる。核酸の供給源は、真核または原核細胞性でよく、好ましくは脊椎動物、特に哺乳動物、最も好ましくは動物またはヒトに由来するものでよい。

【0020】

本発明の態様では、核酸は、固相に結合しており、固相は、修飾されていない、すなわち核酸は、固相への結合を媒介する化合物なしで直接結合される。核酸は、固相の非修飾表面に結合し、それにより、表面への結合は、固相が孔を含有し、そして核酸が固相の孔の中の表面に結合され得ることをも考慮に入れる。本発明による態様では、固相は、好ましくは非修飾表面を有し、特定の条件下で核酸を結合できるイオン交換体(Amersham Bio sciences Europe, Freiburg, Germanyより市販される)、ヒドロキシルアパタイト(Sigma, Taufkirchen, Germanyより市販される)、ガラスもしくはシリカ、またはガラスもしくはシリカを含んでなる材料でよい。別の態様では、固相は修飾されている、すなわち固相は、固相への結合を媒介する化合物を用いて、例えば表面に付着するオリゴヌクレオチドまたはビオチン標識DNAに結合しているストレプトアビシン(固相の表面に付着している)への核酸の配列が特異的な結合により、核酸を間接的に結合する。従って適切な粒子は、DYNAL, Oslo, Norwayから市販され、例えばW090/064045に記載されている。

【0021】

「非修飾」なる用語は、さらなる化学的修飾が存在しない、すなわち他の化学基が共有結合的に、または非共有結合的に付着されないことを意味する。「非修飾表面」、「非修飾シリカ表面」または「非修飾ガラス表面」なる用語は、核酸が中間物質に結合し、そしてシリカ表面そのものには結合していない、核酸結合のための中間物質として提供される他の化学基が共有結合的に、または非共有結合的に付着していないことを意味する。従って、核酸は、好ましくは水素結合および別の原子力により「非修飾表面」に直接結合する。修飾されている表面の実例は、配列特異的な様式で核酸分子を結合するオリゴヌクレオチドが付着しているシリカ表面である。修飾されたシリカ表面に関する別の例は、ビオチン化されたDNA分子に結合しているストレプトアビシンでコートされたシリカ表面である。

【0022】

40

本発明による特定の好ましい態様では、固相は、好ましくは非修飾(ガラスまたはシリカ)表面を有するガラスまたはシリカを含む材料、例えばグラスファイバーまたは珪藻土、ガラスピーツもしくは粒子、ガラス膜もしくは磁性ガラス粒子、または非修飾ガラス表面で被覆された他の物質である。とりわけ好ましいのは、ガラスフリースまたはガラス膜または磁性ガラス粒子である。かかる固相は、例えば欧州特許第0389063号または米国特許第5234809号にて開示されている。

【0023】

DNAまたは核酸をガラスまたはシリカ表面へ結合する条件は、基本的には当業者に公知である。この方法は、種々の文献において詳細に記載されている。Vogelstein, B.およびGillespie, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 615-619 (1979)では、例えばヨウ化

50

ナトリウムの存在下、アガロースゲル由来の核酸を研磨フリントガラスへ結合する方法が提示されている。過塩素酸ナトリウムの存在下、ガラス粉末上の細菌由来のプラスミドDNAの精製がMarko, M. A. ら、Anal. Biochem. 121: 382-387 (1982) に記載されている。DE-A

3734442では、酢酸を用いてファージ粒子を沈殿することによるグラスファイバーフィルター上的一本鎖M13ファージDNAの単離および過塩素酸塩でのファージ粒子の溶解が記載されている。グラスファイバーフィルターに結合している核酸を洗浄し、次いでメタノール含有Tris/EDTA緩衝液で溶出する。ラムダファージからDNAを精製するための類似の手順がJakobi, R. ら、Anal. Biochem. 175: 196-201 (1988) に記載されている。手順は、カオトロピック塩溶液中、核酸のガラス表面への選択的結合および夾雜物、例えばアガロース、タンパク質または細胞残留物からの核酸の分離を必要とする。ガラス粒子を夾雜物から分離するために、粒子が遠心分離されるか、またはグラスファイバーフィルターを通して液体が抜き取られ得る。しかしながら、これは、その手順を大量のサンプルを処理するのに用いることが妨げられる限定的な工程である。本発明の好ましい態様では、例えばAlderton, R. P. ら、Anal. Biochem. 201: 166-169 (1992) およびPCT GB91/00212に記載されているように、塩およびエタノールを添加することにより沈殿させた後、磁性ガラス粒子を用いて核酸を結合する。
10

【 0 0 2 4 】

本発明の非常に好ましい態様では、固相は、好ましくは非修飾ガラス表面を有している磁性ガラス粒子である。磁性ガラス粒子は、ガラス中の小型の磁性核の固体分散物であり、すなわちこれは、非常に小型の磁性の物体が分散されているガラス小滴である。磁性体と称されるこの物体は、磁石、すなわち例えばフェリもしくは強磁性または超常磁性材料に引き付けられる。常磁性物質は、磁石には極弱くしか引き付けられないので有用ではなく、これは本発明による方法には十分でない。好ましいのは、とりわけ未だ前磁化されていない場合の、フェリまたは強磁性材料である。この局面では、前磁化は、残留磁気を増加させる磁石と接触させることを意味すると理解される。好ましい磁性材料は、鉄または酸化鉄、例えば磁鉄鉱 (Fe_3O_4) または、 Fe_2O_3 好ましくは $\gamma-Fe_2O_3$ である。原則的には、バリウム・フェライト、ニッケル、コバルト、Al-Ni-Fe-Co合金またはその他のフェリもしくは強磁性材料を用いることができる。本発明によりとりわけ好ましいのは、W096/418
11、W000/32762およびW001/37291に記載されている磁性ガラス粒子である。
20

【 0 0 2 5 】

本発明の非常に好ましい態様では、鉄は続く増幅反応のインヒビターである、すなわち、鉄は、酵素インヒビターであるので、磁性ガラス粒子は、低い鉄腐食を有する。従って、これは、磁性ガラス粒子の重要な特徴である。好ましくは、水または1M HCl中の鉄腐食(20分間)は40ppmを下回り、より好ましくは20ppmを下回り、最も好ましくは10ppmを下回る。本発明の最も好ましい態様では、磁性ガラス粒子は、国際特許出願W001/37291に記載されているものであり、これは、MagNA Pure LC DNA単離キットI (Roche, Mannheim, Germany) で市販されている。これらの粒子は、ゆっくり沈殿し、従って本発明による自動化された方法において有利に用いることができる。その生成を以下に要約する。
30

【 0 0 2 6 】

磁性ガラス粒子は、実質的には球形であり、そして直径は小さく、そして直径5から500nmの少なくとも1つの磁性物体を含有する。これは、沈殿動態において驚くべき結果を有し、粒子の50%が特定の容量のエレメントから沈殿するまでのタイムスパンである半減時間の値、 $t_{1/2}$ 、により定量化される。イソプロパノール中の本発明の非修飾ガラス表面を有するMGPの3mg/ml重量／容量懸濁液の沈殿に関する半減期は、3分、好ましくは4分、より好ましくは6分を上回る。しかしながら、半減期に関する最も好ましい値は、10分、またはさらには20分を上回る。最も好ましいMGPの磁性物体は、例えば磁性色素でよい。磁性物体の大きさは、ナノスケールの範囲、すなわち5から500nm、好ましくは10から200nm、最も好ましくは15から50nmである。適切な磁性色素は、CERAC社により製造されており、平均直径23nmであり、そして $\gamma-Fe_2O_3$ から成る (BET表面 $50m^2/g$ 、CERAC: P.O. Box 117
8, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178, USA; 商品番号I-2012)。本発明による最も好ま
40
50

しい磁性ガラス粒子は、MGPが高解像度走査性電子顕微鏡により測定される場合、 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ から $5\text{ }\mu\text{m}$ 、好ましくは $1\text{ }\mu\text{m}$ から $2\text{ }\mu\text{m}$ の粒子直径を有しており、一方磁性物体は、前記したように 5 から 500 nm 、好ましくは 10 から 200 nm 、最も好ましくは 15 から 50 nm の範囲の直径を有しているという事実によりさらに特徴づけられる。従って、高解像度走査性電子顕微鏡により測定される場合、磁性色素核の磁性ガラス粒子に対する直径比率が $1:10$ 以下であることによりMGPはさらに特徴づけられる。最も好ましいMGPは、微孔性であるが、高度に構造化されており、従って $6\text{ m}^2/\text{g}$ を超える比較的広い表面を有している。好ましくは、磁性ガラス粒子は、 5 から $100\text{ m}^2/\text{g}$ 、好ましくは 5 から $90\text{ m}^2/\text{g}$ 、より好ましくは 10 から $50\text{ m}^2/\text{g}$ 、最も好ましくは 15 から $30\text{ m}^2/\text{g}$ の範囲の表面積を有している。これは、自動化された市販の装置を用いるBraunauer-Emmett-Teller法により決定することができる。この方法、いわゆるBET法の論議については、Braunauer、「The Absorption of Gases and Vapors」(1943)、Princeton University Pressを参照されたい。
10

【 0 0 2 7 】

本発明で用いる磁性ガラス粒子は、本質的にはW001/37291に記載されている異なった処方で提供され得る。これを錠剤の形態で、粉末として、または好ましくは懸濁液として提供することができる。本発明の好ましい態様では、これらの懸濁液は、 5 から 60 mg/ml の磁性ガラス粒子(MGP)を含有する。本発明の別の態様では、場合によっては、カオトロピック剤を 2 から 8 mol/l 、好ましくは 4 から 6 mol/l の濃度で含有してもよい緩衝水溶液に、シリカ含有材料を懸濁する。カオトロピック塩は、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、チオシアノ酸グアニジニウム、イソチオシアノ酸グアニジニウム、または塩酸グアニジニウムである。本発明によるカオトロピック剤は、液体の水の規則正しい構造の配置を変え、そしてこの剤がDNAまたはRNAを含有する溶液に存在する場合、DNAまたはRNAが本発明のMGPに結合する効果を有する任意の化学物質である。当業者に公知の別の化合物もまた可能である。
20

【 0 0 2 8 】

本発明の好ましい態様では、磁性ガラス粒子は、W001/37291、W000/37291、およびW096/41811に記載されるゾル・ゲル法により製造され、とりわけゾル・ゲル法は：
 -ゾル中に磁性物体を懸濁する工程；
 -ゾルを加水分解して磁性物体をゲルで被覆する工程；
 -ゲルで被覆された磁性物体を2ノズル噴霧ドライヤーで噴霧乾燥する工程；および
 -噴霧乾燥した粉末を焼結して磁性物体を被覆するゲルからガラスを形成する工程；
 を含む。
30

【 0 0 2 9 】

本発明の好ましいMGPは、磁性色素としてミクロナ・マット・ブラックを含有するW000/32762の実施例8に従って製造された磁性ガラス粒子である。本発明の最も好ましいMGPは、国際特許出願W001/37291に従って製造され、これは、MagNA Pure LC DNA単離キットI(Roche, Mannheim, Germany)でも提供される。これはまた、国際特許出願W001/37291に記載されるゾル・ゲル法により直径約 23 nm の磁性物体または色素を用いて生成される($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ から成り、CERAC製、CERAC: P.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178, USA;商品番号I-2012)。磁性物体をゲルに被覆した後、2液体ノズルを通してスラリーを噴霧して粉末を作製する。適切な噴霧乾燥システムは、Nubilosa Molekularzerstoubung, Ladish GmbH & Co. KG, Konstanz, Germanyにより作製される、例えば「Labor-Zerstoubungstrockner (LTK型)」またはBuchi AG, Uster, Switzerlandにより作製される、例えばMini Spray Dryer (B-191型)により作製される。磁性核のガラスシェルに対する直径比率が $1:10$ 以下、好ましくは $1:10$ から $1:1000$ であるので、組み込まれた磁性核またはその不活性担体のジオメトリーおよび数は、粒子の形状および大きさを決定しないが、製造条件、とりわけ噴霧乾燥中の条件を決定する。換言すれば、噴霧乾燥手順の間の圧力、入口温度、出口温度および流速の選択は、大きさ分布、ガラス滴の形状を決定する自由度であり、そしてそれによりMGPを修飾する。従って噴霧乾燥システムのノズルは加熱されている。入口温度は、 120°C から 500°C の間、好ましくは 170°C から 230°C 、または 150°C
40
50

から230℃の間、最も好ましくは150℃から200℃、または190℃から210℃の間かまたは200℃で、もしくはそれよりわずかに低い。出口温度は、ゾルの沸点に、そしてそれにより溶媒に依存し、溶媒の沸点を超えて、それと同等でも、またはわずかに、すなわち10℃未満低くてもよい。エタノールを溶媒として用いる場合、50℃から300℃、好ましくは70℃から150℃、最も好ましくは80℃から110℃である。最適な温度は、90℃から100℃である。ノズル圧は、3バールを上回り、好ましくは4から6バールに制御されている。正確なパラメーターは、用いる噴霧乾燥システムに依存するという事実は技術者に理解されよう。しかしながら、技術者は、本発明の教示をいずれか別の噴霧乾燥システムに移すことができ、そして本発明の開示を考慮に入れるによりパラメーターを見出すことができる。

Masters: 「Spray Drying Handbook」 (1991)、John Wiley & Sons, New Yorkに記載される处方により、別の設定のためにはどのパラメーターを選択すべきかを見出す方法を導くことができる。好ましくは、噴霧乾燥システムのマニュアルについて問い合わせるか、または噴霧乾燥システム製造者の技術サービスに連絡するであろう。収量を最適化するために、焼きしまりまたは焼結温度は、できるだけ高く、すなわち融解範囲よりもわずかに低くすべきである。正確な温度は、ガラス組成に依存するが、400℃から1200℃の間である。W001/37291に記載されるEJガラス組成の場合、焼結温度は、720℃から770℃、好ましくはおよそ750℃である。本発明の教示を考慮に入れる場合、各々のガラス組成に関する温度を見出すのは技術者の技術範囲である。以後、粉末を200℃まで1時間加熱し、場合によつては、室温まで冷却してもよく、そして窒素環境下、加熱速度1K/分で750℃（焼きしまりまたは焼結温度）まで加熱し、そしてその温度を1時間維持する。次いで炉を150℃まで冷却し、そして空気中再度200℃まで1時間加熱する。室温まで冷却した後、粉末をふるい(50μm)に移し、そして30分間ふるいにかける。ふるいにかけたサンプルを瓶詰めし、200℃で4時間滅菌し、次いで80℃まで冷却する。次いでガラス溶液をオープンから取り、滅菌ホイルで被覆して閉鎖する。

【0030】

(好ましくは磁性ガラス粒子の)、非修飾ガラスまたはシリカ表面への核酸の結合のための実験手順は、以下に詳細に記載できる。その手順は、1から8モル/l、および好ましくは2から6モル/lの濃度のカオトロピック塩の存在下で、好ましく実施される。カオトロピック塩は、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、チオシアニ酸グアニジニウム、イソチオシアニ酸グアニジニウム、または塩酸グアニジニウムでよい。本発明によるカオトロピック剤は、液体の水の規則正しい構造の配置を変え、そしてこの剤がDNA(またはRNA)含有溶液に存在する場合、DNA(またはRNA)が磁性ガラス粒子に結合する効果を有する任意の化学物質である。当業者に公知の別の生物学的物質もまた存在する。さらに別の物質もまた可能である。核酸および場合によつては別の生物学的化合物の混合物を結合させるために、非修飾ガラス表面を有するガラスピーブを混合物に加え、そして結合が生じるのに十分な時間インキュベートする。専門家は、通常インキュベーション工程の時間を熟知している。異なる時点で表面に固定されている核酸の量を決定することにより、この工程を最適化することができる。10秒から30分のインキュベーション時間が核酸に適当である。次いで亜硫酸水素塩反応の異なる工程を実施するための試薬を加える(または以前から存在していてもよい)。インキュベーションまたは洗浄の後、核酸を液体から分離する。これは、一般に重力により、または磁性ガラス粒子に結合している核酸に都合のよい場合は、磁場を適用することにより磁性ガラス粒子に結合している核酸を分離することにより、達成できる。例えば磁性粒子を、インキュベーションを行つた容器の壁面に引き付けることができる。次いで磁性粒子に結合しなかつた生物学的化合物または反応成分を含有する液体を除去することができる。用いる除去手順は、インキュベーションを行つた容器の型に依存する。適切な工程として、ビベッティングまたは吸引による液体の除去が挙げられる。次いで、W099/40098に記載されるように、結合している核酸を含む材料を少なくとも1回、好ましくはエタノール70容量部と水30容量部の混合物(「70% エタノール」)または酸性洗浄溶液で洗浄できる。核酸および標的核酸の材料表面からの遊離を引き起こさないが、できるだけ完全に、望ましくない夾雜物を洗い流す洗浄溶液を使用する。好まし

10

20

30

40

50

くは、結合している核酸を含むガラスまたはシリカをインキュベートすることによりこの洗浄工程を行う。好ましくは、材料をこの工程中に再懸濁する。好ましくは、夾雜した洗浄溶液だけを前記した結合工程と同様に除去する。最後の洗浄工程後、材料を減圧下、簡単に乾燥させることができるか、または液体を蒸発させることができる。アセトンを用いる前処理工程を実施してもよい。

【 0 0 3 1 】

本発明の態様では、核酸は、本発明の固相および当業者に公知の方法を用いて生物学的サンプルから得られる。生物学的サンプルは、多細胞生物（例えば、ヒトおよび動物細胞）からの細胞（例えば白血球）、並びに免疫学的に活性な低および高分子化学化合物（例えば、ハプテン、抗原、抗体および核酸、血漿、脳脊髄液、喀痰、便、生検標本、骨髓、洗口液、血清、組織、尿またはその混合物）を含む。本発明の好ましい態様では、生物学的サンプルは、ヒトまたは動物体由来の液体である。好ましくは、生物学的サンプルは、血液、血漿、血清または尿である。血漿は、好ましくは、EDTA処理、ヘパリン処理、またはクエン酸処理した血漿である。核酸を含む生物学的サンプルを溶解して、核酸およびその他の成分を含む生物学的化合物の混合物を作る。生物学的サンプルを溶解する手順は、技術者に公知であり、そして本質的に化学的、酵素的または物理学的であり得る。これらの手順の組み合わせも、同様に適用できる。例えば、溶解は、超音波、高圧、剪断力、アルカリ、界面活性剤もしくはカオトロピック生理食塩水溶液、またはプロテアーゼもしくはリバーゼを用いて実施され得る。核酸を得るために溶解手順に関しては、詳細な参照は、Sambrookら ; Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NYおよびAusubelら ; Current Protocols in Molecular Biology 1987、J. Wiley and Sons、NYになされる。次いで、核酸は、本発明の方法および固相を用いて溶解混合物から単離され、次いで、本発明の方法、すなわち本発明の亜硫酸水素塩処理に供され得る。カオトロピック剤をまた用いて、細胞を溶解し、核酸と他の生物学的物質間で混合物を調製する（例えば、Sambrookら (1989) またはEP0389063参照）。その後、ガラスまたはシリカを含む材料が添加され、精製効果は、これらの条件下、すなわち特定の濃度のカオトロピック剤、より高濃度の有機溶媒の存在下または酸性条件下で、DNAまたはRNAがガラス表面を有する材料に結合する挙動から得られる。従つて、本発明はまた、溶解工程および亜硫酸水素塩反応の組み合わせをも考慮し、すなわち核酸と他の生物学的物質との混合物から単離された核酸は、直接亜硫酸水素塩処理に供され、それにより、核酸は、脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程中に固相に結合される。より詳細には、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基をウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換、それにより好ましくは5-メチルシトシン塩基が有意には変換されない方法（「亜硫酸水素塩反応」または「亜硫酸水素塩処理」）が提供され、それにより、核酸が、固相、好ましくはガラスまたはシリカを含む材料に結合することにより、核酸と生物学的化合物とを含む混合物から単離され、亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間、固相に結合されたままである。さらにもっと詳細には、核酸が核酸と他の生物学的化合物との混合物から単離され、そして亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程および／または脱スルホン化工程の間、固相に結合されている方法が提供される、すなわち、

- a) 核酸と他の生物学的化合物との混合物を提供する工程；
- b) 核酸を固相に結合し、任意に他の生物学的化合物を除去し、そして任意に固相結合核酸を洗浄する工程；
- c) 亜硫酸水素イオンの存在下、固相結合核酸をインキュベートして、それにより核酸が脱アミノされる工程；
- d) 任意に脱アミノされた固相結合核酸を洗浄する工程；
- e) アルカリ条件下で脱アミノされた固相結合核酸をインキュベートして、それにより脱アミノされた核酸が脱スルホン化される工程；
- f) 任意に脱アミノされ、そして脱スルホン化された固相結合核酸を洗浄する工程；ならびに

10

20

30

40

50

g) 任意に脱アミノされ、そして脱スルホン化された核酸を固相から溶出する工程を含み、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基をウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換し、それにより好ましくは5-メチルシトシン塩基が有意には変換されない方法（「亜硫酸水素塩反応」または「亜硫酸水素塩処理」）が提供される。

【 0 0 3 2 】

別の態様では、核酸が、核酸と他の生物学的化合物との混合物から単離され、そして亜硫酸水素塩反応の脱スルホン化工程の間、固相に結合されている方法が提供される、すなわち、

- a) 核酸と他の生物学的化合物との混合物を提供する工程；
- b) 核酸を固相に結合し、任意に他の生物学的化合物を除去し、任意に固相結合核酸を洗浄し、そして固相から核酸を溶出する工程；
- c) 亜硫酸水素イオンの存在下、溶出された核酸をインキュベートして、それにより核酸が脱アミノされる工程；
- d) 脱アミノされた核酸を固相に結合する工程；
- e) 任意に脱アミノされた固相結合核酸を洗浄する工程；
- f) アルカリ条件下で脱アミノされた固相結合核酸をインキュベートして、それにより脱アミノされた核酸が脱スルホン化される工程；
- g) 任意に脱アミノされ、そして脱スルホン化された固相結合核酸を洗浄する工程；ならびに

h) 任意に脱アミノされ、そして脱スルホン化された核酸を固相から溶出する工程；を含み、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基をウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換し、それにより好ましくは5-メチルシトシン塩基が有意には変換されない方法（「亜硫酸水素塩反応」または「亜硫酸水素塩処理」）が提供される。

【 0 0 3 3 】

本発明の別の態様では、核酸が核酸と他の生物学的化合物との混合物から単離され、そして亜硫酸水素塩反応の脱アミノ工程の間、固相に結合されている方法が提供される、すなわち、

- a) 核酸と他の生物学的化合物との混合物を提供する工程；
- b) 核酸を固相に結合し、任意に他の生物学的化合物を除去し、そして任意に固相結合核酸を洗浄する工程；
- c) 亜硫酸水素イオンの存在下、固相結合核酸をインキュベートして、それにより核酸が脱アミノされる工程；
- d) 任意に固相結合核酸を洗浄する工程；
- e) 脱アミノされた核酸を固相から溶出する工程；
- f) アルカリ条件下で脱アミノされた核酸をインキュベートして、それにより脱アミノされた核酸が脱スルホン化される工程；

を含み、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基をウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換し、それにより好ましくは、5-メチルシトシン塩基が有意には変換されない方法（「亜硫酸水素塩反応」または「亜硫酸水素塩処理」）が提供される。

【 0 0 3 4 】

本発明の好ましい方法は、さらに固相から結合核酸を溶出する工程を含む。次いで、該核酸は、例えば、増幅され得る。溶出を行うためには、（非修飾シリカ表面を有する）ガラスまたはシリカを含む材料が、カオトロピック剤およびまたは有機溶媒を全く含まないかまたは低量しか含まない溶液に再懸濁される。あるいは、懸濁液は、カオトロピック剤および／または有機溶媒を全く含まないかまたは低量しか含まない溶液で希釈され得る。この特性の緩衝液は、DE3724442およびJakobiら（前出）から公知である。塩含量の低い溶出緩衝液は、とりわけ0.2モル/1未満の含量を有する緩衝液である。とりわけ好ましい

10

20

30

40

50

態様では、溶出緩衝液は、緩衝目的でTris物質、とりわけおよそ7または7を超えるpHを有するTris緩衝溶液を含有する。別の特定の態様では、溶出緩衝液は、脱塩水である。核酸を含有する溶液は、固相が除去された後、ここで増幅反応に使用される準備ができている。従って、核酸は、増幅に必要な全ての試薬を含む新たな反応チューブに移される。任意に、増幅に必要な全ての試薬を含有する溶液は、固相および放出核酸の懸濁液に添加される。別の態様では、増幅に必要な全ての試薬を含有する溶液は、固相および結合核酸の懸濁液に溶出工程なしで添加し、それにより固相上の核酸の増幅が実施される。

【 0 0 3 5 】

本発明によれば、洗浄および結合工程のために、好ましくは、分子生物学における方法、とりわけデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)精製方法に適した、液体が使用され、これらの方法は、特定の条件下でこれらの物質の固相、とりわけシリカまたはガラス表面、さらに特に磁性ガラス粒子への結合を利用する。好ましい液体は、アルコールおよび/またはケトン、あるいはそれと水との任意の混合物を含む。本発明に使用されるアルコールとしては、好ましくは、一般式R-OH(式中、Rは一般式 $-(-\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ (n≥0)を意味する)の第1級、第2級または第3級アルコールが挙げられる。しかしながら、分子生物学的目的に適している場合、他のアルコール、例えばグリセロールもまた使用され得る。特に適しているものは、アルコール類、イソプロパノール、エタノールまたはそれと水との混合物であり、好ましくはイソプロパノール80容量部と水20容量部との混合物である。本発明の別の態様では、液体は、ケトン、例えばアセトンを含む。さらに、適切な緩衝液水溶液が使用される。分子生物学的目的に適している緩衝液系は、Sambrook, J. ら「Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989)」、J. Sambrook, E.F. FritschおよびT. Maniatis編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYにおいて見出すことができる。好ましい緩衝液物質は、Tris-ヒドロキシメチルアミン(TRIS)、リン酸塩、N-(2-ヒドロキシ-エチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES)、その塩または他の適切な物質である。さらに、溶液のイオン強度を変化させる物質、例えばNaCl、KClもしくはCaCl₂または金属カチオン錯化剤、例えばエチレンジアミン四酢酸(EDTA)もしくはその塩が存在し得る。

【 0 0 3 6 】

本発明の好ましい態様では、核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR; EP0201184、EP-A-0200362、米国特許第4683202号)で増幅される。増幅方法はまた、リガーゼ連鎖反応(LC R, Wu, D.Y.およびWallace, R.B.、Genomics 4: 560-569 (1989) およびBarany, F.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193 (1991))；ポリメラーゼリガーゼ連鎖反応(Barany, F.、PCR Methods Appl. 1: 5-16 (1991))；ギャップLCR(PCT特許公開番号W090/01069)；修復連鎖反応(欧州特許公開番号EP439182A2)、3SR(Kwoh, D.Y.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177 (1989)；Guatelli, J.C.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878 (1990)；PCT特許公開番号W092/0880A)、およびNASBA(米国特許第5130238号)でもよい。さらに、鎖置換増幅(SDA)、転写媒介増幅(TMA)、およびQβ-増幅(概説に関しては、例えばWhelen, A.C.およびPersing, D.H.、Annu. Rev. Microbiol. 50: 349-373 (1996)；Abramson, R.D.およびMyers, T.W.、Curr. Opin. Biotechnol. 4: 41-47 (1993)参照)がある。特に好ましい本発明の増幅方法は、米国特許第5786146号に開示されている、亜硫酸水素塩処理および対立遺伝子特異的PCR(例えば、米国特許第5137806号、米国特許第5595890号、米国特許第5639611号参照)を組み合わせたメチル化特異的PCR法(MSP)である。

【 0 0 3 7 】

好ましい態様では、方法はさらに増幅された核酸を検出する工程を含んでなることができる。当業者に公知であり、そして例えばSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor University Press (1989)、LottspeichおよびZorbas、「Bioanalytik」L. a. Zorbas編、Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany、またはAusubel, F. ら、「Current Protocols in Molecular Biology」(1994)、F. Ausubel、R. BrentおよびK. R. E. 編、Wiley & Sons Verlag, New Yorkに記載されている標準的な

分析方法により増幅された核酸を決定または検出することができる。標的核酸を検出する前に別の精製工程、例えば沈殿工程もある。検出方法には非限定例としては二本鎖DNAにインターラートし、その後のその蛍光を変化させる臭化工チジウムのような特異的な染料の結合またはインターラートさせることなどがある。精製された核酸を、任意に制限消化した後、電気泳動法により分離し、その後可視化することもできる。特異的配列に対するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション、およびそれに続くハイブリッドの検出を利用するプローブ基盤のアッセイもある。当業者に公知の別の工程の後、標的核酸をシークエンシングすることもできる。別の方針により多様な核酸配列を特異的プローブが結合しているシリコンチップに適用し、相補的配列が結合した場合にシグナルを発生させる。

10

【 0 0 3 8 】

本発明のとりわけ好ましい態様では、増幅中の蛍光強度を測定することにより核酸を検出する。この方法はリアルタイムで蛍光をモニター観察する必要がある。蛍光強度を測定することにより増幅および検出を同時に利用する特に好ましい方法は、W092/02638および対応する米国特許第5,210,015号、米国特許第5,804,375号、米国特許第5,487,972号に開示されるTaqMan(登録商標)法である。この方法はポリメラーゼのエクソヌクレアーゼ活性を利用してシグナルを発生させる。詳細には、標的核酸の領域に相補的な配列を含有するオリゴヌクレオチドおよび同一の標的核酸鎖の第2の領域に相補的な配列を含有するが、第1のオリゴヌクレオチドにより定義される核酸配列を含まない標識オリゴヌクレオチドとサンプルを接触させて、ハイブリダイゼーション条件下で二本鎖の混合物を作製することを含んでなる方法により核酸を検出し、ここで二本鎖は、第1のオリゴヌクレオチドの3'末端が標識オリゴヌクレオチドの5'末端に隣接するよう第1のオリゴヌクレオチドおよび標識オリゴヌクレオチドにアニーリングしている標的核酸を含んでなる。次いでポリメラーゼの5'から3'ヌクレアーゼ活性を許容するのに十分な条件下で5'から3'ヌクレアーゼ活性を有する鋳型依存性核酸ポリメラーゼでこの混合物を処理し、アニーリングされ、標識されたオリゴヌクレオチドを切断し標識フラグメントを遊離させる。標識オリゴヌクレオチドの加水分解により発生したシグナルを検出および/または測定する。TaqMan(登録商標)技術により、形成されて検出可能になる、固相に結合した反応複合体の必要性が排除される。より一般的には、本発明による方法の増幅および/または検出反応は均質溶液相アッセイである。さらに好ましい方法はLightCycler(登録商標)装置で用いられる様式である(例えば米国特許第6174670号参照)。とりわけ好ましいのは、亜硫酸水素塩処理、メチル化特異的プローブの存在下でのメチル化特異的プライマーを伴うかまたは伴わない増幅、および米国特許第6331393号に記載されるリアルタイム蛍光検出の使用である。

20

30

30

【 0 0 3 9 】

本発明の好ましい態様では、方法を自動化する、すなわち例えばW099/16781に記載されるような自動化できる方法を実施する。自動化できる方法とは、その方法の工程が、ヒトによる外的制御または影響がほとんどまたは全くなくて作動できる装置または機械で実施されるのに適していることを意味する。自動化された方法とは、自動化できる方法の工程が、ヒトによる外的制御または影響がほとんどまたは全くなくて作動できる装置または機械で実施されることを意味する。方法の準備工程のみが手動により行われなければならない、例えば貯蔵容器を充填し、そして配置しなければならず、サンプルの選択および当業者に公知の別の工程、例えば制御コンピューターの操作はヒトにより行わなければならない。装置または機械は例えば自動的に液体を添加するか、サンプルを混合するか、または特異的温度でインキュベーション工程を実施することができる。典型的にはかかる機械または装置は、単一の工程および命令が指定されているプログラムを実行するコンピューターにより制御されるロボットである。本発明の好ましい態様では、方法は高速大量処理様式であり、すなわち方法および使用する機械または装置が短時間で大量のサンプルについて最適化されることを意味する高速大量処理様式で自動化された方法を実行する。

40

【 0 0 4 0 】

50

好ましくは本発明による方法は、診断分析のためもしくは生物分析のための、またはヒトもしくはさらには動物体からの組織もしくは液体のスクリーニングのための、特定のメチル化パターンの存在に関する診断において用いられる。さらに、本発明による方法を用いて核酸におけるメチル化部位の検出の速度、精度または感受性を増強させる。

【 0 0 4 1 】

好ましい態様では、本発明は亜硫酸水素イオンの存在下、好ましくは5-メチルシトシン塩基は有意には変換されないで、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基がウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換される反応（「亜硫酸水素塩反応」）の脱アミノおよび／または脱スルホン化工程における固相の使用に関する。好ましい態様では、本発明は、亜硫酸水素イオンの存在下、好ましくは5-メチルシトシン塩基は有意には変換されないで、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基がウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換される反応（「亜硫酸水素塩反応」）の脱アミノおよび／または脱スルホン化工程における固相の使用に関する。さらにとりわけ、これは亜硫酸水素塩反応の脱アミノおよび／または脱スルホン化工程の間、固相を用いて核酸を結合させる、すなわち、亜硫酸水素塩反応の脱アミノおよび／または脱スルホン化工程の間、核酸は固相に結合されていることを意味する。好ましくは、固相はシリカまたはガラスを含んでなる物質である。最も好ましくは固相はガラスフリースまたはガラス膜である。最も好ましい態様では、固相は磁性ガラス粒子である。

【 0 0 4 2 】

別の好ましい態様では、本発明は亜硫酸水素イオンおよび固相を含んでなる溶液を含有する亜硫酸水素塩反応を実施するためのキットに関する。好ましい態様では、固相はシリカまたはガラスを含んでなる物質である。より好ましい態様では、固相はガラスフリースまたはガラス膜である。最も好ましい態様では、固相は磁性ガラス粒子である。本発明の別の態様では、本発明による磁性ガラス粒子またはその懸濁物を含む貯蔵溶液を含んでなるパツクから成るキットが提供される。技術分野で公知のかかるキットはさらに亜硫酸水素塩手順の間に使用され得るプラスチック製品、例えば96もしくは384ウェル様式のマイクロタイタープレートまたは例えばEppendorf, Hamburg, Germanyにより製造された反応チューブを含んでなる。キットはさらに固相、とりわけガラスフリースもしくは膜または磁性ガラス粒子の洗浄工程に適した洗浄溶液を含んでなってもよい。洗浄溶液はしばしば使用前に希釈されなければならない貯蔵溶液として提供される。キットはさらに溶出剤、すなわち固相に結合しているDNAまたはRNAを溶出するための溶液またはバッファー（例えばTE、10mM Tris、1mM EDTA、pH8.0）または純粋な水を含んでなってもよい。さらに、本発明での使用に適したバッファーを含む別の試薬が存在してもよい。好ましくは、本発明によるキットは亜硫酸水素イオンの存在下、好ましくは5-メチルシトシン塩基は有意には変換されないで、核酸中のシトシン塩基、好ましくは複数のシトシン塩基がウラシル塩基、好ましくは複数のウラシル塩基に変換される反応に用いられる。

【 0 0 4 3 】

以下の実施例、参照および図面は本発明の添付の請求の範囲で示される真の範囲の理解を助けるために提供される。本発明の精神から逸脱せずに、示した手順に修飾を行うことができることは理解される。

【 実施例 】

【 0 0 4 4 】

1.1 実施例

1. 実施例1：亜硫酸水素塩処理DNAに特異的なLC-PCRの確立

1.1 一般論

亜硫酸水素塩反応が作用し、そして非メチル化シトシンをウラシルに変換するという事実は、ポリメラーゼ連鎖反応により実証され、ここで非メチル化シトシンがウラシルに変換されている核酸配列の領域に特異的であるプライマーを使用する、すなわちプライマーのアデニン塩基は非メチル化シトシンからの亜硫酸水素塩反応生成物であるウラシルと向かい合っている。不完全な変換の場合、プライマーのアデニン塩基に対応しないシトシン

10

20

30

40

50

があるので、プライマーはこの領域にハイブリダイズできない。これはPCR生成物が得られるという効果を有する。

【 0 0 4 5 】

迅速なポリメラーゼ連鎖反応を実施するための改善された方法が例えば米国特許第6,174,670号に開示されており、LightCycler（登録商標）装置（Roche, Mannheim, Germany）で用いられている。この方法では、2つの標識プローブは増幅依存的な様式で近くまで接近し、2つの標識が蛍光エネルギー転移（FRET）を行うことができるようになる。それによる増幅物の量は特定の波長の放出光の強度と相関する。従って適当なプローブおよびプライマーを用いて、例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼπ遺伝子のプロモーター領域を分析することにより（例えばこの遺伝子の全長配列およびプロモーターに関して 10 配列番号：1、米国特許第5552277号、Genbank寄託番号M24485およびMorrowら、Gene75 : 3-11 (1989) を参照）この特異的PCR法を用いて非メチル化シトシンの完全な変換が得られるかどうかを分析することができる。しかしながら、当業者は別の方法をこの評価に同様に用いることができるこを知っている。蛍光測定は反応の初期のサイクルで得られる最初の蛍光測定、すなわちバックグラウンド蛍光で割ることにより正規化され、一方サイクル間の蛍光測定は相対的に一定であるようだ。最初の蛍光測定に選択されるサイクル数は比較される全ての反応に関して同一であり、全ての測定は同一の反応サイクルと相対的に増大することが示される。ポリメラーゼ連鎖反応増幅の初期サイクルにおいて標的分子数を幾何学的な等式： $N_i = N_0 \times (1+E)^i$ 、ここで N_0 =反応の出発点での標的分子数、 $N_i=i$ 番目のサイクルの完了時の標的分子数、 E =増幅効率 ($0 < E < 1$) により記載する 20 ことができる。この増幅のゲノム成長相の間、特定の閾値に到達するのに必要なサイクル数 (C_t 値または交差点) は $(1+E)$ の対数に反比例する。従って、 C_t 値は反応間の比較を可能にする反応効率の尺度を示す。反応がより少ないサイクルで閾値に到達することを意味する C_t 値の低下は、反応効率の増大を示している。増幅産物の増大は反応中の蛍光の増大を測定することによりモニター観察されるので、本明細書では C_t は蛍光が任意の蛍光レベル (AFL) を越えるまでに実施された増幅サイクル数として定義される。AFLは蛍光基底レベル近くに選択されたが、測定された無作為の蛍光の変動の範囲を超え、増幅の幾何学的成长相の間に反応動態が測定された。後期サイクルにおける増幅産物の蓄積は反応を阻止し、そして実際に反応プラトーに導く。全反応のために AFL1.5 を選択した。PCR増幅は別個のサイクルからなり、そして蛍光測定をサイクルあたりに1回実施し、測定された蛍光は典型的には1サイクルで AFL未満から AFLより高くなるに増大する。測定の精度を改善するため、本明細書では C_t 値または交差点と称される AFL閾値に到達する「正確な」サイクル数はサイクル間の蛍光測定を補間することにより算出された。 30

【 0 0 4 6 】

1.2 一般的な方法

以下の実験は記載したLightCycler（登録商標）装置での記載されたPCRを亜硫酸水素塩処理DNAの評価手段として用いることができるることを実証する。設計されたプライマー/プローブ組み合わせにより、亜硫酸水素塩処置の後のDNAのみで陽性の結果が得られる。亜硫酸水素塩処理DNA（この場合、亜硫酸水素塩DNAを実施例2に記載するプロトコルに従って処理した）および未処理DNAを同一の鉄型濃度（PCRあたり20ngおよび1ng）を用いて平行して増幅した。 40

【 0 0 4 7 】

1.3 LightCycler（登録商標）装置におけるPCR分析

1.3.1 マスター ミックスの組成

LS FastStart DNA Master Hybridization Probe 1x、2 mM MgCl₂、0.5 μM フォワードプライマー、0.5 μM リバースプライマー、250 nM ドナープローブ、250 nM アクセプタープローブ、鉄型 10 μl、全PCR容量 20 μl。

【 0 0 4 8 】

1.3.2 PCR条件

変性 10分 / 95°C

55サイクル 95℃ / 10秒
 65℃ / 10秒 シグナル獲得
 72℃ / 10秒 ランプ時間 20℃ / 秒

【 0 0 4 9 】

1.4 結果

【表 1】

MDNA / PCR	亜硫酸水素塩処理	C _T - 値または交差点
20 ng	あり	30.55 29.72 29.95 30.06
1 ng	あり	34.7 35.8 34.07 33.86
20 ng	なし	成長曲線なし 成長曲線なし 成長曲線なし 成長曲線なし
1 ng	なし	成長曲線なし 成長曲線なし 成長曲線なし 成長曲線なし

10

20

30

【 0 0 5 0 】

結果は亜硫酸水素塩処理したDNAに関してのみの交差点を示す。従ってこのPCRは亜硫酸水素塩法を評価するのに適している。当業者には、プライマー/プローブ組み合わせが亜硫酸水素塩処理の前にDNAと反応しないことが保証されれば、評価手段としていずれのPCRを用いるかは明白である。

【 0 0 5 1 】

2. 実施例2：磁性ガラス粒子（MGP）を用いる亜硫酸水素塩反応

2.1.1 DNAの変性

メチル化されたDNA (Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供；Cat S 7821) 希釀物 (30ngおよび6ng/hDNA 1000ngバックグラウンドでスパイクしたアッセイ、Rocheカタログ番号1691112；濃度あたり10複製) 100μlおよび2M NaOH 12μlを混合し、そして37℃で15分間インキュベートする。

【 0 0 5 2 】

2.1.2 DNAの脱アミノ

変性DNA 112μlを亜硫酸水素塩試薬 (2.5M 亜硫酸水素ナトリウム、125mM ヒドロキノン、pH5.0) 200μlと混合物し、50℃で16時間インキュベートする。

【 0 0 5 3 】

2.2 MGPを用いる加工

脱アミノDNA 312μlを結合バッファー (MagNaPure DNA単離キットI、Rocheカタログ番号3003990) 600μlおよび磁性ガラス粒子溶液 (MagNaPure DNA単離キットI) 75μlと混合

40

50

し、そして絶えず攪拌しながら室温で15分間インキュベートする。その後、磁性ガラス粒子を70% エタノール1mlで3回洗浄する。磁気選別機（Rocheカタログ番号1641794）で結合していないものを分離する。その後、90% EtOH/20mM NaOH 250μlをMGPに結合しているDNAに添加することにより脱スルホン化を行い；混合物を混合しながら室温で10分間インキュベートする。その後MGPを90% エタノールで2回洗浄する。エタノールの残りを除去するために、ふたを開けたサーモミキサー中で15分/60℃でMGPを加熱した。その後、10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5 (15分/60℃) 50μlでDNAを溶出する。溶出したDNA 10μlを次のPCR分析で用いる。

【 0 0 5 4 】

2.3 Intergenキットを用いる亜硫酸水素塩処理

10

メチル化したDNA (Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供；カタログ番号S7821) 30ngおよび6ngをIntergen CpGenome DNA修飾キット (Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供；カタログ番号S7820) の包装折り込みに記載されている方法に従って処理した（濃度あたり10複製）。溶出されたDNA 10μlを次のPCR分析に用いる。

【 0 0 5 5 】

2.4 LightCycler (登録商標) 装置 (ハイプロープ様式) における特異的PCRを用いて亜硫酸水素塩処理したDNAの検出

2.4.1 マスターミックスの組成

LightCycler (登録商標) FastStart DNA Master Hybridization Probe 1x (Roche 22392 20 72) 、 2mM MgCl₂ 、 0.5 μM フォワードプライマー、 0.5 μM リバースプライマー、 250nM ドナープロープ、 250nM アクセプタープロープ、 鑄型10μl、 全PCR容量20μl。

【 0 0 5 6 】

2.4.2 PCR条件

変性 10分 / 95℃

55サイクル 95℃ / 10秒

65℃ / 10秒 一シグナル獲得

72℃ / 10秒 ランプ時間 20℃ / 秒

MGP亜硫酸水素塩処理およびIntergen亜硫酸水素塩処理からのサンプルをLightCycler (登録商標) 装置の同一の作用で平行して作用させた。

30

【 0 0 5 7 】

2.4.3 結果

【表 2】

複製	メチル化DNA		使用した亜硫酸水素塩法	
	亜硫酸水素塩	PCR	Intergen	MGP 法
C_T -値または交差点				
1	30 ng	6 ng	29.90	30.46
2			30.07	29.86
3			30.07	30.44
4			30.14	30.35
5			30.22	30.24
6			30.26	30.46
7			30.31	30.50
8			30.19	30.54
9			30.03	30.17
10			29.85	30.69
1	6 ng	1.2 ng	32.49	32.14
2			32.67	32.60
3			32.29	32.83
4			32.87	32.53
5			32.15	32.90
6			32.23	32.77
7			32.59	32.73
8			32.91	33.09
9			32.46	32.88
10			33.17	32.83

10

20

30

【0058】

リアルタイムPCRの間に算出された C_T 値または交差点は用いた双方の亜硫酸水素塩法に関してほとんど同一であり、すなわち方法の性能が同一である。

【0059】

3. 実施例3：MGPを用いる自動化亜硫酸水素塩反応

3.1 亜硫酸水素塩反応の性能

3.1.1 DNAの変性

メチル化されたDNA (Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供；カタログ番号S7821) 希釀物 (50ng/アッセイ) 20 μ l、ポリ(dA) 溶液 (濃度250ng/ μ l) 4 μ lおよび2M NaOH 2.6 μ lを混合し、そして37°Cで10分間インキュベートする。 40

【0060】

3.1.2 DNAの脱アミノ

変性DNA 26 μ lを亜硫酸水素塩試薬 (2.5M 亜硫酸水素ナトリウム、125mM ハイドロキノン、pH5.0) 220 μ lと混合し、50°Cで4時間インキュベートする。

【0061】

3.1.3 MagNaPure LC装置を用いる自動化処理

脱アミノDNA 250 μ lを結合バッファー (MagNaPure DNA単離キットI, Roche, Mannheim, Germany) 600 μ lおよび磁性ガラス粒子溶液 (MagNaPure DNA単離キットI, Roche, Mann 50

heim, Germany) 75 μ lと混合し、そして絶えず攪拌しながら室温で15分間インキュベートする。その後、磁性ガラス粒子を70% エタノール1mlで3回洗浄する。その後、90% EtOH/20mM NaOH 250 μ lをMGPに結合しているDNAに添加することにより脱スルホン化を行い；混合物を混合しながら室温で10分間インキュベートする。その後MGPを90% エタノールで2回洗浄し、10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5 (7分/80°C) 50 μ lで溶出する。

【 0 0 6 2 】

3.1.4 LightCycler (登録商標) 装置 (ハイプロープ様式) における特異的PCRを用いることによる亜硫酸水素塩処理したDNAの検出

3.1.4.1 マスター ミックスの組成

LightCycler (登録商標) FastStart DNA Master Hybridization Probe 1x, 2 mM MgCl₂, 10 μ M フォワードプライマー、0.5 μ M リバースプライマー、250 nM ドナープローブ、250 nM アクセプタープローブ、錆型5 μ l、全PCR容量20 μ l。

【 0 0 6 3 】

3.1.4.2 PCR条件

変性 10分 / 95°C

55サイクル 95°C / 10秒

65°C / 10秒 レシグナル獲得

72°C / 10秒 ランプ時間20°C / 秒

【 0 0 6 4 】

3.1.4.3 結果

20

【表 3 】

テンプレート	ng DNA		
		PCRあたり	交差点
ユニバーサルメチル化DNA	100	10	33.97
			36.66
ユニバーサルメチル化DNA	50	5	35.66
			35.82
			37.67
			38.37
ユニバーサルメチル化DNA	10	1	37.82
			39.89
			38.76
			39.85

30

【 0 0 6 5 】

結果は用いた各々の濃度に関する交差点を示している。これは自動化された亜硫酸水素塩処理が成功したこと意味している。

【 0 0 6 6 】

4. 実施例4：ガラスフリースを用いる亜硫酸水素塩反応の性能

4.1 DNAの変性

メチル化されたDNA (Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供；カタログ番号S7821) 希釀物 (30ngおよび6ng/アッセイ、各濃度当たり10複製) 100 μ lを2M NaOH 12 μ lと混合し、そして37°Cで15分間インキュベートする。

【 0 0 6 7 】

4.2 DNAの脱アミノ

変性DNA 112 μ lを亜硫酸水素塩試薬 (2.5M 亜硫酸水素ナトリウム、125mM ハイドロ 50

キノン、pH5.0) 200μlとともに絶えず混合しながら16時間/50℃でインキュベートする。

【 0 0 6 8 】

4.3 ハイピュアPCR鑄型調製キット (Rocheカタログ番号1796828) での脱アミノされたDNAの処理

・脱アミノDNA312μlをキットからの結合バッファー200μlおよびイソプロパノール100μlと混合し、そしてガラスフリースを伴うカラムにピペットイングする。次いでカラムをエッペンドルフ・テーブルトップ遠心機で遠心分離する(1分/8000rpm)。

・その後、カラムを80% エタノール500μlで各々3回洗浄する(遠心分離10秒/12000rpm)。

・脱スルホン化のために試薬(38% エタノール/100mM NaCl/200mM NaOH) 250μlを 10カラムに加える。5分/室温のインキュベーションの後、遠心分離1分/800rpm。

・その後、カラムを80% エタノール500μlで各々2回洗浄する(遠心分離10秒/12000rpm)。

・最後に、予め加温した(70℃) 溶出バッファー(10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5) 50μlを加えることにより結合しているDNAを溶出し、遠心分離1分/800rpm。

【 0 0 6 9 】

4.4 LightCycler(登録商標) 装置(ハイプロープ様式)における特異的PCRを用いることによる亜硫酸水素塩処理したDNAの検出

4.4.1 マスターミックスの組成

LightCycler(登録商標) FastStart DNA Master Hybridization Probe 1x (Roche 2239 20272)、2mM MgCl₂、0.5μM フォワードプライマー、0.5μM リバースプライマー、250nM ドナープロープ、250nM アクセプタープロープ、鑄型10μl、全PCR容量20μl。

【 0 0 7 0 】

4.4.2 PCR条件

変性 10分/95℃

55サイクル	95℃/10秒
	65℃/10秒 シグナル獲得
	72℃/10秒 ランプ時間20℃/秒

【 0 0 7 1 】

4.4.3 結果

30

【表4】

メチル化DNA		C _T -値または 交差点	メチル化DNA		C _T -値または 交差点
亜硫酸水素塩 アッセイ	PCR		亜硫酸水素塩 アッセイ	PCR	
30 ng	6 ng	32.27	6 ng	1.2 ng	34.28
		32.01			35.70
		31.89			35.52
		33.23			36.23
		32.18			35.05
		32.63			35.60
		32.65			34.75
		32.26			34.86
		32.00			34.80
		31.84			34.93

40

【 0 0 7 2 】

50

結果は用いた各々の濃度に関する交差点を示している。これはガラスフリースを用いる亜硫酸水素塩処理が成功したことを意味している。

【 0 0 7 3 】

5. 実施例5：ガラスフリース固相における亜硫酸水素塩反応の性能

5.1 DNAのガラスフリースへの結合

DNA (hDNA (Roche) 1 μ g およびメチル化DNA (Intergen, Serologicals Corporation, Norcross, GA, USAより提供；カタログ番号S7821) 100ngの混合物) 100 μ lを結合バッファー (ハイピュアPCR鑄型調製キット、Rocheカタログ番号1796828) 200 μ lおよびイソプロパノール100 μ lと混合物する。混合物をキットからのカラムにピペッティングする。次いでカラムをエッペンドルフ・テープルトップ遠心機で遠心分離する (1分/8000rpm)。フ 10 リースをキットからの洗浄バッファーで2回洗浄する (洗浄工程あたり500 μ l)。

【 0 0 7 4 】

5.2 ガラスフリースに結合したDNAの変性

38% EtOH/100mM NaOH/200mM NaCl 200 μ lをガラスフリースにピペッティングし、室温で10分間双方をインキュベートすることにより変性をさせる。

【 0 0 7 5 】

その後フリースをキットからの洗浄バッファー500 μ lで1回洗浄する。

【 0 0 7 6 】

5.3 ガラスフリースに結合したDNAの脱アミノ

脱アミノ溶液 (6.25M 尿素/2M 亜硫酸水素ナトリウム/pH5.0) 200 μ lを、DNAを伴う 20 フリースにピペッティングし、続いて水浴中50℃で16時間インキュベートする。

【 0 0 7 7 】

その後脱アミノ試薬を除去し、フリースをキットからの洗浄バッファー各々500 μ lで2回洗浄する。

【 0 0 7 8 】

5.4 ガラスフリースに結合した脱アミノされたDNAの脱スルホン化

脱スルホン化のために試薬 (90% エタノール/20mM NaOH) 250 μ lをカラムに加える。15分/室温のインキュベーションの後、カラムを1分/8000rpmで遠心分離する。その後、カラムを各々80% エタノール500 μ lで2回洗浄する (10秒/12000rpm遠心分離)。

【 0 0 7 9 】

5.5 DNAの溶出

最後に、予め加温した (70℃) 溶出バッファー (10mM Tris/0.1mM EDTA pH7.5) 50 μ lを加えることにより結合しているDNAを溶出し、遠心分離1分/8000rpm。

【 0 0 8 0 】

5.6 LightCycler (登録商標) 装置 (ハイプローブ様式) における特異的PCRを用いることによる亜硫酸水素塩処理したDNAの検出

5.6.1 マスター ミックスの組成

LightCycler (登録商標) FastStart DNA Master Hybridization Probe 1x (Roche 2239 272)、2mM MgCl₂、0.5 μ M フォワードプライマー、0.5 μ M リバースプライマー、250 nM ドナープローブ、250nM アクセプタープローブ、鑄型10 μ l、全PCR容量20 μ l。

【 0 0 8 1 】

5.6.2 PCR条件

変性 10分/95℃

55サイクル 95℃/10秒

65℃/10秒 - シグナル獲得

72℃/10秒 ランプ時間20℃/秒

【 0 0 8 2 】

5.6.3 結果

30

40

【表 5】

サンプル番号	PCRあたりのメチル化DNA	交差点
1	20ng	34.90
2	20ng	35.27
3	20ng	36.09
4	20ng	36.80

【0083】

10

各々の反応において、成長曲線が検出され、そして交差点が算出された。この結果はガラスフリース上での脱アミノおよび脱スルホン化が可能であることを示している。

【0084】

参考文献一覧

Abramson, R. D. および Myers, T. W., Curr Opin Biotechnol 4 (1993) 41-7

Alderton, R. P. ら、Anal Biochem 201 (1992) 166-9

Ausubel, F. ら、「Current protocols in molecular biology」 (1994), F. Ausubel, R. Brent および K. R. E. 編, Wiley & Sons Verlag, New York

Barany, F., PCR Methods Appl 1 (1991) 5-16

Barany, F., Proc Natl Acad Sci U S A 88 (1991) 189-93

20

Benyajati, C. ら、Nucleic Acids Res 8 (1980) 5649-67

Braunauer, 「The Adsorption of Gases and Vapors」 (1943), Princeton University Press

Clark, S. J. ら、Nucleic Acids Res 22 (1994) 2990-7

独国特許第3724442号明細書

独国特許出願公開第37 34 442号明細書

欧州特許第0 200 362号明細書

欧州特許第0 201 184号明細書

欧州特許第0 389 063号明細書

欧州特許第0 439 182号明細書

30

Feil, R. ら、Nucleic Acids Res 22 (1994) 695-6

Frommer, M. ら、Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 1827-31

英国特許第91/00212号明細書

Grigg, G. および Clark, S., Bioessays 16 (1994) 431-6

Grigg, G. W., DNA Seq 6 (1996) 189-98

Grunau, C. ら、Nucleic Acids Res 29 (2001) E65-5

Guatelli, J. C. ら、Proc Natl Acad Sci USA 87 (1990) 1874-8

Jakobi, R. ら、Anal Biochem 175 (1988) 196-201

Komiyama, M. および Oshima, S., Tetrahedron Letters 35 (1994) 8185-8188

Kwoh, D. Y. ら、Proc Natl Acad Sci U S A 86 (1989) 1173-7

40

Lottspeich および Zorbas, 「Bioanalytik」 (1998), L. a. Zorbas 編, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany

Marko, M. A. ら、Anal Biochem 121 (1982) 382-7

Morrow, C. S. ら、Gene 75 (1989), 3-11

Oakeley, E. J., Pharmacol Ther 84 (1999) 389-400

Olek, A. ら、Nucleic Acids Res 24 (1996) 5064-6

Paulin, R. ら、Nucleic Acids Res 26 (1998) 5009-10

Raizis, A. M. ら、Anal Biochem 226 (1995) 161-6

Sambrook, J. ら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」 (1989), Eds. J. Sambrook, E. F. Fritsch および T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold S

50

pring Harbor, NY

Spray Drying Handbook (1991), John Wiley & Sons, New York

米国特許第4,683,202号明細書

米国特許第5,130,238号明細書

米国特許第5,137,806号明細書

米国特許第5,210,015号明細書

米国特許第5,234,809号明細書

米国特許第5,487,972号明細書

米国特許第5,552,277号明細書

米国特許第5,595,890号明細書

米国特許第5,639,611号明細書

米国特許第5,786,146号明細書

米国特許第5,804,375号明細書

米国特許第6,174,670号明細書

米国特許第6,331,393号明細書

Vogelstein, B. およびGillespie, D., Proc Natl Acad Sci U S A 76 (1979) 615-9

Warnecke, P. M. ら、Methods 27 (2002) 101-7

Whelen, A. C. およびPersing, D. H., Annu Rev Microbiol 50 (1996) 349-73

国際公開第00/32762号パンフレット

国際公開第00/37291号パンフレット

国際公開第01/37291号パンフレット

国際公開第01/98528号パンフレット

国際公開第02/31186号パンフレット

国際公開第90/01069号パンフレット

国際公開第90/06045号パンフレット

国際公開第92/02638号パンフレット

国際公開第92/0880A号パンフレット

国際公開第96/41811号パンフレット

国際公開第99/16781号パンフレット

国際公開第99/40098号パンフレット

Wu, D. Y. およびWallace, R. B., Genomics 4 (1989) 560-9

【産業上の利用可能性】

【0085】

本発明は、核酸におけるメチル化の位置、すなわちメチル化および非メチル化シトシンを決定するために利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0086】

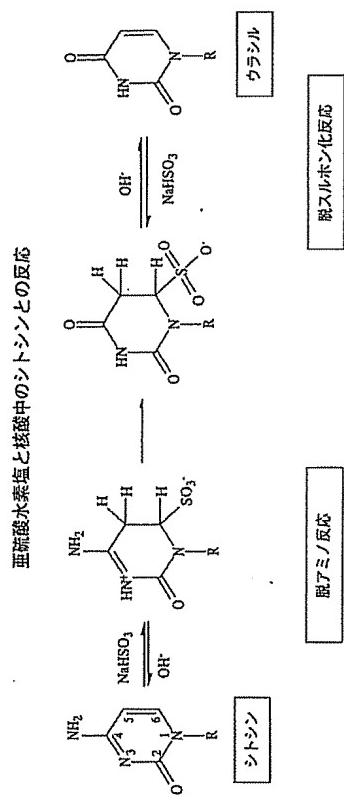
【図1】図1は、亜硫酸水素塩と核酸中のシトシンとの反応を示した図である。

10

20

30

【図 1】



【配列表】

20040891950000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ディルク ブロック
ドイツ連邦共和国 ピッヒル 83673 クロイトヴェーク 10
Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 HA20